



**Universidade Nova de Lisboa**

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Avaliação do potencial inseticida de um novo produto no controlo  
de mosquitos vetores

Maria Inês Nogueiro Guerra

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS NA ESPECIALIDADE DE PARASITOLOGIA  
MÉDICA

JANEIRO, 2016



**Universidade Nova de Lisboa**

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Avaliação do potencial inseticida de um novo produto no controlo  
de mosquitos vetores

**Autor:** Maria Inês Nogueiro Guerra

**Orientador:** Professora Doutora Teresa Novo

**Coorientador:** Professor Doutor Paulo Almeida

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas na Especialidade de  
Parasitologia Médica

## **Agradecimentos**

Quero aqui expressar o meu agradecimento a todos aqueles que de alguma forma apoiaram e tornaram possível a realização deste trabalho:

À Professora Doutora Teresa Novo, da Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica, pela orientação e ajuda em toda a execução deste trabalho, pela paciência e pela confiança depositada.

Ao Professor Doutor Paulo Almeida, da Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica, pela partilha de conhecimento, esclarecimentos, cooperação e disponibilidade prestada.

Ao Doutor Patrick Freire, Biomimetx, Lda, pela oportunidade de aprendizagem e colaboração neste trabalho.

Ao Professor Doutor Celso Cunha, coordenador do Mestrado em Ciências Biomédicas, por toda a disponibilidade e atenção dispensada.

A todos os colegas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical que me ajudaram neste percurso.

Aos meus amigos e colegas de mestrado, pelo apoio, incentivo, amizade e boa disposição contagiante nos momentos mais difíceis.

À minha família, a força e o suporte sempre presentes.

E por fim, agradeço à minha tia Inês, por ser um exemplo.

## Índice

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de abreviaturas .....	iii
Índice de figuras.....	v
Índice de tabelas.....	vii
<b>I. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1. Mosquitos (Diptera, Culicidae) .....</b>	<b>1</b>
I.1.1. Sistemática .....	1
I.1.2. Importância dos mosquitos como vetores de agentes patogénicos .....	3
I.1.3. Ciclo de vida .....	4
I.1.4. Alimentação sanguínea e ciclo gonotrófico.....	5
I.1.5. Desenvolvimento larvar .....	7
I.1.6. Biologia das pupas.....	9
I.1.7. Adultos .....	10
I.1.7.1. Morfologia do adulto .....	130
I.1.7.2. Biologia do adulto .....	13
<b>I.2. Principais métodos de controlo vetorial .....</b>	<b>12</b>
I.2.1. Controlo biológico.....	13
I.2.2. Controlo químico .....	14
I.2.3. Controlo genético .....	15
<b>I.3. Inseticidas .....</b>	<b>16</b>
<b>I.4. Larvicidas .....</b>	<b>17</b>
I.4.1. Óleos e películas de superfície.....	18
I.4.2. Larvicidas químicos .....	18

I.4.3. Biocidas .....	19
I.4.4. Espinosinas .....	21
I.4.5. Reguladores de crescimento de insetos .....	21
I.5. Mecanismos de resistência .....	22
II. Objetivos .....	26
III. Materiais e Métodos .....	28
III.1. Manutenção da colônia de mosquitos <i>Culex theileri</i> e <i>Anopheles atroparvus</i> .....	28
III.2. Preparação do secretoma bacteriano .....	29
III.3. Análise do efeito larvicida do secretoma bacteriano .....	29
III.3.1. Ensaio com secretoma bacteriano liofilizado .....	30
III.3.2. Ensaio com secretoma bacteriano filtrado .....	31
III.3.3. Ensaio com fração .....	32
III.4. Análise e apresentação de dados .....	32
III.5. Montagem das larvas .....	33
IV. Resultados e Discussão .....	35
IV.1. Potencial larvicida do secretoma bacteriano .....	35
IV.1.1. Ensaio com secretoma bacteriano liofilizado .....	35
IV.1.2. Ensaio com secretoma bacteriano filtrado .....	39
IV.1.3. Ensaio com fração .....	43
IV.2. Alterações morfológicas observadas em larvas sob efeito do produto .....	48
V. Conclusão .....	55
VI. Referências Bibliográficas .....	58
Anexos .....	68

## Resumo

Cada vez mais se tem mostrado essencial a descoberta de novos métodos eficazes contra mosquitos vetores das mais importantes doenças. Um dos principais motivos para a procura deve-se ao aparecimento de resistências por parte dos vetores, não só a inseticidas químicos como mais recentemente a biológicos. Deste modo, este estudo foca-se na avaliação de um novo produto natural que apresenta potencial para atuar como biocida. A partir deste produto, que consiste no secretoma de uma bactéria *Pseudomonadaceae spp.*, foram preparados vários lotes com diferentes concentrações do mesmo. Posteriormente, os lotes foram testados individualmente em ensaios com larvas L3 final-L4 inicial de *Culex theileri* e *Anopheles atroparvus*. A gama de concentrações testada em cada ensaio foi maioritariamente de 25%, 50%, 75% e 100%. Os ensaios foram acompanhados e registados até 24 horas e os imaturos foram coletados. Em todos houve registo de mortalidade, embora os resultados fossem variáveis entre ensaios.

Na segunda fase do estudo, os imaturos sujeitos ao produto e aos controlos foram montados entre lâmina e lamela e posteriormente observados ao microscópio ótico. Este procedimento visou compreender o mecanismo de ação do produto sobre as larvas. Para tal, foram registadas entre larvas do controlo e larvas de ensaio todas as diferenças morfológicas, possivelmente causadas pelo produto. No entanto, estas só foram detetáveis em apenas dois ensaios, sendo os restantes inconclusivos nesta matéria.

A capacidade inseticida deste produto foi confirmada através dos ensaios realizados, tanto em *Culex theileri* como *Anopheles atroparvus*. Este estudo foi uma primeira avaliação do produto, ficando em falta a obtenção de reprodutibilidade entre ensaios e a descoberta dos constituintes ativos, ou metabolitos secundários, constituintes do secretoma que apresentam características biocidas. Da mesma forma que será necessária uma abordagem mais aprofundada para compreender o mecanismo de ação do produto, recorrendo a técnicas laboratoriais mais específicas, uma vez que a examinação por microscopia ótica não foi produtiva para a maioria dos ensaios. Em suma, é fundamental a procura e exploração de novos inseticidas para travar não só o aparecimento de resistências como a expansão dos vários mosquitos vetores e das doenças transmitidas pelos mesmos.

*Palavras-chave:* *Culex theileri*, *Anopheles atroparvus*, secretoma bacteriano, inseticida

## Abstract

Increasingly, it has been proven essential the discovery of new effective methods against mosquito vectors responsible for several important diseases. One of the main reasons for the widespread demand resides on the emergence of vectors' resistance, not only to chemical but also to biological insecticides. This study focuses on the evaluation of a new natural product that has the potential to act as a insecticide. From this product, consisting of a *Pseudomonadaceae spp.* bacteria secretome, several batches were prepared with different concentrations. Subsequently, the batches were individually tested in trials with final L3-initial L4 larvae of *Culex theileri* and *Anopheles atroparvus*. The range of concentrations tested in each assay were mainly 25%, 50%, 75% and 100%. After 24 hours, the mortality results were monitored and recorded, and the immatures were collected. In every assay mortality was observed, although the results did not show agreement between them.

In the second phase of the study, the immature exposed to the product and respective controls were prepared and observed with optical microscope. This procedure aimed to understand the product's mechanism of action on the larvae. To this end, all possible changes caused by the product were analysed between control larvae and larvae test. However, these changes were only detectable in two trials, the remaining ones were inconclusive in this regard.

The insecticide capability of this product was confirmed by the tests performed, in both *Cx. theileri* as well as in *An. atroparvus*. This study was an initial evaluation of the product, although the secretome compound or compounds which have biocides features were not discriminated as well as the reproducibility between trials. Likewise it will be necessary a further approach to define the mechanism of action of the product, using more specific laboratory techniques, since the examination by optical microscopy did not prove to be effective for most assays. In short, it is essential to search and explore new insecticide alternatives to fight not only the emergence of resistance but also the expansion of various mosquito vectors and diseases.

**Keywords:** *Culex theileri*, *Anopheles atroparvus*, bacterial secretome, insecticide

## Lista de abreviaturas

**AChE** - Acetilcolinetransferase

**ADN** - Ácido desoxirribonucleico

**An.** - *Anopheles*

**Bs** - *Lysinibacillus sphaericus* (= *Bacillus sphaericus*)

**Bti** - *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

**°C** - Graus Celsius

**Cx.** - *Culex*

**DDT** - Diclorodifeniltricloroetano

**g** - Força centrífuga

**g/L** – Gramas por litro

**h** - Horas

**IHMT** - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**IRS** - *Indoor residual spraying*

**ITN** - *Insecticide-treated nets*

**kDa** - Quilodalton

**L** - Litro

**LSM** - *Larval Source Management*

**Mg** – Magnésio

**mL** – Mililitro

**mm** - Milímetro

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**SIT** - *Sterile insect technique*



*Spp.* - Espécies

μm – Micrómetro

## Índice de figuras

Figura 1 - Ciclo de vida dos mosquitos (culicíneos) (adaptado de <a href="http://winnipeg.ca/publicworks/bugline/mosquitoes/mosquito_information.stm">http://winnipeg.ca/publicworks/bugline/mosquitoes/mosquito_information.stm</a> ). Acedido em abril de 2015. ....	5
Figura 2 - Diferentes estádios do ciclo gonotrófico de um mosquito fêmea (adaptado de Service, 2012). ....	6
Figura 3 - Larvas de mosquito culicíneo (a) e anofelíneo (b) (adaptado de Eldridge, 2005). ....	8
Figura 4 - Morfologia do mosquito adulto (culicíneo fêmea) (adaptado de Service, 2012). ....	11
Figura 5 – Mecanismo de ação de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> : a) epitélio intestinal de uma larva <i>Aedes aegypti</i> saudável; b) epitélio intestinal após 30 minutos da ingestão das proteínas cristal; c) célula prestes a sofrer lise celular (adaptado de Becker et al., 2010). ....	20
Figura 6 - Aspecto geral de ensaio para testar a acção larvicida, com o Ensaio VI com larvas de <i>Cx. theileri</i> , em meio bacteriano filtrado. Neste exemplo são utilizadas tinas de 200 mL de capacidade e 25 larvas por tina, com dois controlos negativos e quatro concentrações (5%, 10%, 25%, 50%) (Fotografia da autora). ....	32
Figura 7 - Mortalidade após 24 horas no Ensaio I, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão, para 2 réplicas por concentração, de 25 larvas cada. ....	36
Figura 8 - Mortalidade após 24 horas no Ensaio II, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão, para 3 réplicas por concentração, de 15 larvas cada. ....	36
Figura 9 - Mortalidade após 24 horas no Ensaio III, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão, para 2 réplicas por concentração, de 15 larvas cada. ....	37
Figura 10 - Mortalidade após 24 horas no Ensaio IV, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de <i>Cx. theileri</i> , para 3 réplicas por concentração, de 25 larvas cada. ....	38

<b>Figura 11 - Mortalidade após 24 horas no Ensaio IV, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de <i>An. atroparvus</i>, para 3 réplicas por concentração, de 25 larvas cada. ....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 12 - Mortalidade após 24 horas no Ensaio V, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de <i>Cx. theileri</i>, para 3 réplicas por concentração, de 25 larvas cada. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 13 - Mortalidade após 24 horas no Ensaio VI, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de <i>Cx. theileri</i>, para 3 réplicas por concentração, de 25 larvas cada. ....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 14 - Mortalidade após 24 horas no Ensaio V, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de <i>An. atroparvus</i>, para 3 réplicas por concentração, de 25 larvas cada. ....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 15 - Mortalidade após 24 horas no Ensaio VI, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de <i>An. atroparvus</i>, para 3 réplicas por concentração, de 25 larvas cada. ....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 16- Mortalidade após 24 horas no ensaio com fração, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de <i>An. atroparvus</i>, para 4 réplicas por concentração, de 25 larvas cada. ....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 17- Aspeto de sífão de larvas mortas de <i>Cx. theileri</i> de Ensaio II, ampliação 400x. A- controlo negativo, B-concentração de 25%, C- concentração de 50%, D- concentração de 75%, E e F- concentração de 100%. Fotografias da autora. ....</b>	<b>51</b>

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Média da mortalidade e desvio padrão obtidos com a fração a concentração 100% em <i>Cx. theileri</i> , após 24 horas.....	43
Tabela 2 - Tonalidade das larvas do Ensaio II (10 larvas por concentração). .....	49
Tabela 3- Presença de partículas no tórax, Ensaio II.....	49
Tabela 4 - Número de larvas com partículas presentes nas papilas anais e respectiva quantidade, Ensaio V. ....	53

# **I. Introdução**

## I. Introdução

### I.1. Mosquitos (Diptera, Culicidae)

#### I.1.1. Sistemática

O Filo Arthropoda destaca-se no Reino Animal pelo elevado número de espécies que engloba. Aracnídeos, crustáceos, diplópodes e insetos são dos mais importantes grupos integrantes deste Filo, que diferem entre si no número de apêndices, sua posição e pelo agrupamento dos diferentes segmentos que em conjunto formam as várias partes do corpo (Eldridge, 2005). Dentro destas espécies, sobressaem os mais de 17000 insetos hematófagos com importância médica e 25000 espécies de carraças (Romoser, 2004).

A maioria dos Artrópodes com importância médica pertence à Classe Insecta, apresentando o corpo dividido em três partes distintas – cabeça, tórax e abdômen, e três pares de patas inseridos um por segmentos torácicos. Apesar destas características comuns, os insetos variam bastante na morfologia externa e apresentam dimensões entre 0,2 milímetros a 30 centímetros (Gullan e Cranston, 2005).

A Família Culicidae (Classe Insecta, Ordem Diptera) é constituída por mais de 3500 espécies de mosquitos, agrupadas em 112 géneros (Mosquito Taxonomic Inventory, 2008). As diferentes espécies de mosquitos encontram-se agrupadas nas subfamílias Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae. Com exceção da Antártida e algumas ilhas, os mosquitos estão distribuídos globalmente, desde as zonas tropicais às temperadas e frias, e também em zonas situadas mais a norte, até ao Círculo Polar Ártico. Podem encontrar-se em locais até 3500 metros de altitude ou em minas com uma profundidade de 1250 metros abaixo do nível do mar (Service, 2012).

A subfamília Anophelinae integra três géneros: *Chagasia* e *Bironella*, que não possuem importância médica, e *Anopheles* (Rodhain e Perez, 1985). Este género compreende cerca de 480 espécies, distribuídas não só em zonas tropicais como em regiões temperadas.

A posição de repouso dos anofelíneos adultos consiste em cabeça, tórax e abdómen em linha reta, a um ângulo de  $30^{\circ}$ - $45^{\circ}$  com a superfície. Morfologicamente, os adultos apresentam palpos longos em ambos os sexos (à exceção de *Bironella*) e o abdómen é quase desprovido de escamas. As larvas não possuem sifão respiratório.

Na maioria das espécies de anofelíneos, os ovos têm uma forma semelhante a um barco e são depositados individualmente à superfície de água. Fazem parte da sua constituição duas estruturas laterais com ar, flutuadores, que impedem os ovos de afundar.

A alimentação das larvas dá-se por filtração de partículas na porção superficial da água do biótopo. Dado que estas larvas se mantêm paralelas à superfície, a alimentação é facilitada pela rotação de  $180^{\circ}$  da cabeça (Service, 1993). Os habitats larvares são sobretudo áreas de águas calmas, como margens de lagos e lagoas temporárias ou permanentes (Rodhain e Perez, 1985).

A subfamília Culicinae é a maior das três subfamílias. Desta fazem parte cerca de 2900 espécies que se agrupam em 33 géneros. Os adultos possuem escamas de coloração uniformemente preta ou castanha nas asas, embora por vezes estejam presentes áreas brancas, amareladas ou prateadas. Os palpos nas fêmeas são significativamente mais curtos que o probóscis, contrariamente aos palpos dos machos que atingem o mesmo comprimento que o probóscis, e nalguns casos chegam a ser ligeiramente mais longos. Quando em repouso, os adultos posicionam-se com o corpo paralelo à superfície.

Os ovos de culicíneo variam morfológicamente conforme o género. Em géneros como *Aedes* e *Psorophora*, os ovos são de cor preta e ovais, sendo depositados individualmente. Pelo contrário, os ovos de *Culex* e *Culiseta* são de tom castanho, de forma mais longa e fina, e são colocados perpendicularmente à superfície da água, em conjunto, formando uma estrutura semelhante a uma jangada.

As larvas possuem um sifão respiratório que também lhes permite suspenderem-se à superfície da água, posicionadas para baixo. Estas larvas podem ser predadoras ou filtradoras.

A subfamília Toxorhynchitinae é constituída apenas por um género, *Toxorhynchites*, que apresenta os maiores mosquitos a nível mundial e é identificado como o género mais primitivo dentro da família Culicidae. A quase totalidade das

espécies deste género é tropical. Os adultos possuem o corpo coberto de escamas coloridas e tufos laterais nos segmentos abdominais posteriores. Podem atingir os 19 mm de comprimento e destacam-se ainda pelo probóscis claramente curvado e virado para trás (Service, 1993). A nível dos palpos, enquanto os das fêmeas são curtos, os dos machos são mais longos que o probóscis (Rodhain e Perez, 1985). Tanto os machos como fêmeas se alimentam apenas de néctares açucarados. As fêmeas não efetuam refeições sanguíneas, daí que este género não esteja relacionado com a transmissão de agentes patogénicos. As diferentes espécies são encontradas especialmente em regiões florestadas. Os habitats larvares situam-se normalmente em buracos de árvores e bambus. As fêmeas efetuam as posturas enquanto estão no ar, sem pousarem na água, daí que por vezes os ovos se encontrem em locais quase inacessíveis. Os ovos têm uma aparência granular, de tom amarelado ou branco e flutuam na superfície da água. As larvas variam entre 12 e 18 mm de comprimento e são predadoras, alimentando-se de outras larvas de mosquito e mesmo de larvas da própria espécie. Possuem tal como os culicíneos, um sifão respiratório, porém nas larvas de *Toxorhynchites* este é curto e de forma cónica (Service, 1993).

### I.1.2. Importância dos mosquitos como vetores de agentes patogénicos

Várias espécies de mosquitos são consideradas responsáveis pela transmissão de agentes etiológicos de doenças com elevada importância médica, tais como a malária, febre amarela, de dengue e de Chikungunya, virose do Nilo Ocidental e filaríases (Becker et al., 2010). As espécies da família Culicidae com maior importância médica pertencem aos géneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Haemagogus*, *Mansonia*, *Psorophora* e *Sabethes*. Algumas espécies do género *Anopheles* atuam como vetores de agentes causais de malária humana, filaríases linfáticas (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori*) e também arboviroses. Dentro do género *Culex* são encontradas espécies vetoras de vários arbovirus, e ainda de *Wuchereria bancrofti*. Espécies pertencentes ao género *Aedes* são globalmente vetoras de vírus da febre amarela, de dengue, da virose do Nilo Ocidental e de outras arboviroses e em zonas mais restritas também atuam como vetores de *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi*. Estas filárias são ainda transmitidas por espécies

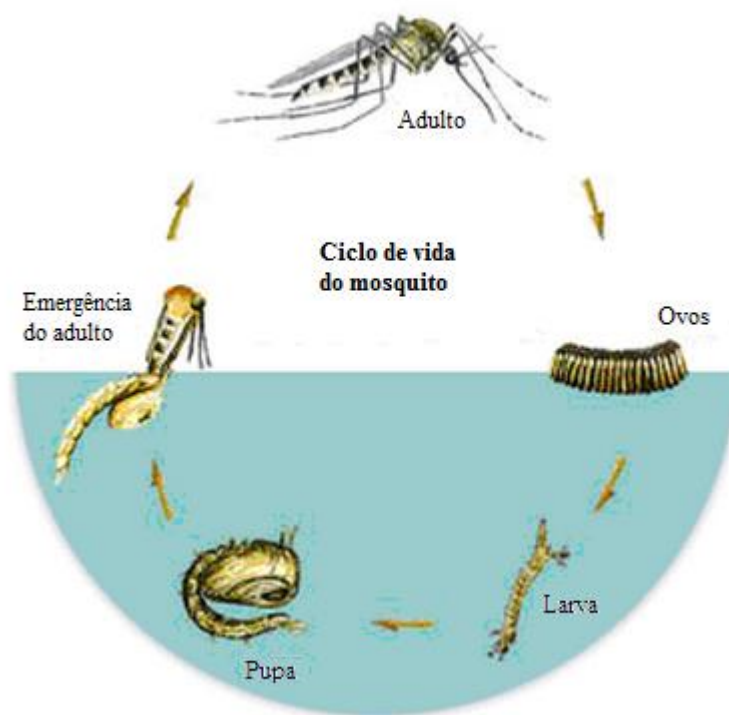


de *Mansonia*, juntamente com outras arboviroses. Mosquitos *Sabethes* e *Haemagogus* são responsáveis pela transmissão do vírus da febre amarela em regiões essencialmente florestadas da América Central e do Sul. Por seu lado, o género *Psorophora* é responsável pela transmissão de arbovírus na América do Norte e do Sul (Service, 2012). *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* são, contudo, os géneros a que pertencem as principais espécies vetoras (Manson-Bahr e Bell, 1987). A atual expansão geográfica, e aumento de densidade populacional das espécies de mosquitos vetores, estão relacionadas com fatores antropogénicos e com alterações climáticas, resultando na emergência, ou re-emergência, de doenças como malária, febre de Chikungunya, de dengue, Zika e virose do Nilo Ocidental, entre outras arboviroses (Bourtzis et al., 2014). Os mosquitos têm capacidade de adquirir o agente patogénico através do mecanismo de sucção de sangue e transmiti-lo de um hospedeiro para outro, graças à sua fisiologia e bioecologia. Vetor e hospedeiro têm de estar proximamente associados para que a transmissão seja eficaz, além de que o vetor deve apresentar suscetibilidade ao completo desenvolvimento do agente infeccioso, designada por competência vetora e deverá ter uma longevidade que permita este completo desenvolvimento no seu seio. A pesquisa entomológica debruça-se sobretudo na família Culicidae, pelo facto de os mosquitos constituírem uma ameaça para humanos e outros vertebrados pelos níveis de mortalidade e morbilidade associados aos agentes patogénicos que transmitem. Estima-se que o risco de doença devida a transmissão vetorial por mosquitos possa afetar mais de metade da população mundial, tanto em zonas tropicais como subtropicais e temperadas (Becker et al., 2010).

### I.1.3. Ciclo de vida

Os mosquitos são insetos holometabólicos, dado que apresentam metamorfoses completas, decorrendo o seu ciclo de vida em dois ambientes distintos, o aquático, fases imaturas, e o terrestre, fase adulta (Figura 1). Os habitats aquáticos, onde ocorre a oviposição e conseqüente desenvolvimento das formas imaturas, podem ser de origem artificial (pneus, tanques, vasos, etc.) ou natural (pântanos, lagoas, poças de água), apresentando características físicas e químicas típicas para cada espécie. Com maior mobilidade que as formas imaturas, também os adultos demonstram preferência por locais

de alimentação, repouso e hibernação caraterísticos da espécie (Woodbridge e Edward, 2002).



**Figura 1** - Ciclo de vida dos mosquitos (culicíneos) (adaptado de [http://winnipeg.ca/publicworks/bugline/mosquitoes/mosquito\\_information.stm](http://winnipeg.ca/publicworks/bugline/mosquitoes/mosquito_information.stm)). Acedido em abril de 2015.

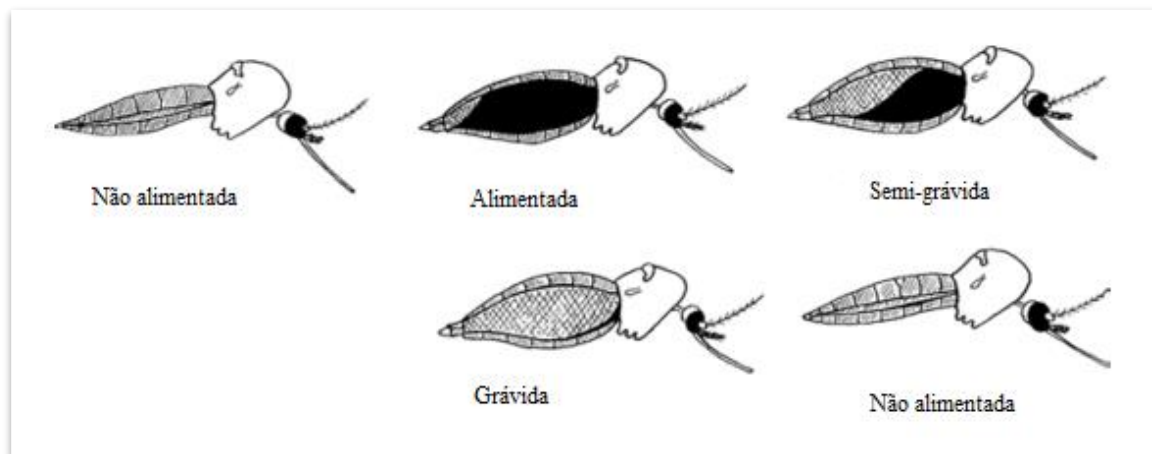
### I.1.4. Alimentação sanguínea e ciclo gonotrófico

Na maioria das espécies, os mosquitos copulam imediatamente após a emergência. Habitualmente, basta uma inseminação durante toda a vida, pois as fêmeas armazenam na espermateca o esperma que servirá para fertilizar todas as posturas realizadas. Salvo algumas exceções, o desenvolvimento dos ovos requer que as fêmeas efetuem uma refeição sanguínea, a fim de adquirirem os nutrientes necessários à sua maturação. Este processo denomina-se anautogénico e é o mais comum nas espécies de mosquitos. Outras espécies não necessitam de refeição sanguínea para proceder à primeira postura (espécies autogénicas). A velocidade da digestão de refeições sanguíneas depende da temperatura

ambiente, sendo que a temperaturas mais elevadas a digestão processa-se mais rapidamente.

A saliva das fêmeas possui enzimas de funções específicas na alimentação sanguínea. As enzimas anti-hemostáticas facilitam a sucção de sangue, criando hematomas na pele do hospedeiro, tal como os anticoagulantes que impedem que o sangue coagule e obstrua a armadura bucal durante o ato de sucção. Por fim, estão ainda presentes substâncias anestésicas, que minimizam a dor que a picada possa causar de modo a evitar reações defensivas por parte do hospedeiro (Service, 2012).

A refeição sanguínea confere ao abdómen um aspeto dilatado e cor avermelhada. Com o decorrer da digestão o abdómen vai escurecendo até começar a ficar esbranquiçado na parte posterior, graças ao início do desenvolvimento dos ovos. Este estado traduz o ponto médio da digestão sanguínea e diz-se que a fêmea se encontra semi-grávida. O desenvolvimento completo dos ovos confere um aspeto totalmente esbranquiçado ao abdómen (Figura 2).



**Figura 2** - Diferentes estádios do ciclo gonotrófico de um mosquito fêmea (adaptado de Service, 2012).

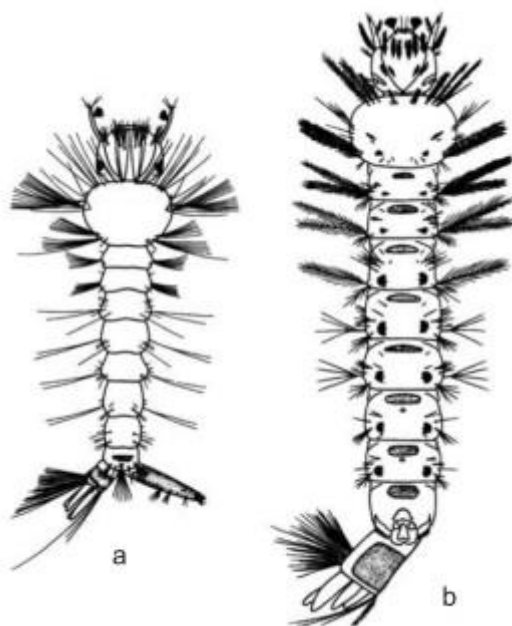
Completada a maturação ovárica, a fêmea procura um local adequado e efetua a oviposição, após o que inicia a busca de novo hospedeiro para realizar outra refeição sanguínea. Este processo, denominado ciclo gonotrófico, repete-se várias vezes ao longo da vida da fêmea. Cada postura é constituída por 30 a 300 ovos, dependendo da espécie.

Os ovos apresentam uma cor escura e medem cerca de 1 mm de comprimento. As fêmeas de espécies dos gêneros *Anopheles* e *Culex* depositam os ovos diretamente na superfície da água (Service, 2012)

### I.1.5. Desenvolvimento larvar

Fatores como a temperatura da água e disponibilidade de alimento são fundamentais para o desenvolvimento larvar, que varia também de espécie para espécie. Enquanto em ambientes tropicais as larvas apresentam um desenvolvimento rápido, em climas temperados ou subárticos podem permanecer em estágio larvar durante os meses mais frios (Service, 1993). É fundamental a existência de água para a sua sobrevivência, embora as larvas de algumas espécies possam resistir a curtos períodos de tempo em ambientes como lama.

As larvas são caracterizadas pela ausência de patas e pelo tórax mais dilatado que a cabeça e o abdômen (Figura 3). A cabeça encontra-se bem desenvolvida e possui um par de antenas e um par de olhos compostos. Recorrendo às escovas orais, as larvas são capazes de filtrar e ingerir partículas de comida em suspensão na água do biótopo. O tórax possui forma arredondada e apresenta sedas longas, ramificadas ou não. O abdômen encontra-se dividido em dez segmentos, sendo nove visíveis, dado que o segmento IX se encontra fundido com o VIII. No segmento VIII está inserido, ventralmente, o segmento X ou anal com as papilas anais, associadas à osmorregulação, e dorsalmente, o par de espiráculos respiratórios (anofelíneos) ou o sifão respiratório (culicíneos e toxorinquitíneos). À exceção dos gêneros *Mansonia* e *Coquillettidia*, as larvas necessitam de vir à superfície da água para respirar. (Service, 2012). Nestes dois gêneros as larvas respiram o ar circulante em plantas aquáticas que obtêm através do seu sifão perfurante.



**Figura 3** - Larvas de mosquito culicíneo (a) e anofelíneo (b) (adaptado de Eldridge, 2005).

A alimentação das larvas tem como base bactérias, protozoários e partículas com origem animal ou vegetal, em suspensão na água (Becker et al., 2010). As larvas podem ser encontradas num vasto leque de habitats aquáticos, desde coleções de água permanente como pântanos e arrozais, a coleções de água temporária, como valas e poças de água. A capacidade de tolerar diferentes tipos de habitats larvares varia conforme a espécie.

As larvas de mosquito passam por quatro estádios larvares até evoluírem para pupa. Em ambientes tropicais há espécies que apresentam um desenvolvimento rápido, entre 5-7 dias, porém para algumas espécies este pode prolongar-se por 7-14 dias. Em climas temperados ou subárticos podem permanecer em estágio larvar durante os meses de inverno (Service, 2012).

### I.1.6. Biologia das pupas

O processo de metamorfose durante a fase de pupa usualmente dura dois dias, embora a temperatura possa alterar a sua duração. Durante esta metamorfose, dá-se a histólise dos órgãos larvares e a formação dos órgãos do adulto, a partir de grupos de células do organismo larvar que se encontravam em quiescência até ao estado de pupa (Becker et al., 2010)

Em todas as espécies de mosquitos, as pupas possuem forma de vírgula, evidenciada pela fusão da cabeça e tórax, que resulta no cefalotórax, e abdómen (Service, 2012). A respiração é feita através das trompetas respiratórias, situadas dorsalmente na porção anterior do cefalotórax. Estas trompetas respiratórias providenciam oxigénio ao adulto em desenvolvimento, através de uma ligação aos seus espiráculos mesotorácicos (Becker et al., 2010).

Dos dez segmentos constituintes do abdómen, são visíveis oito deles, cada um com sedas curtas, apresentando o segmento final duas estruturas terminais achatadas em forma de pá, as paletas natatórias. As pupas são bastante móveis graças a movimentos do abdómen e das paletas. Sendo uma fase de quiescência, e apesar de ativas, as pupas não se alimentam.

A fase pupal termina com a emergência do adulto. Esta dá-se pela ingestão de ar pela pupa que provoca o rompimento da cutícula envolvente do cefalotórax, podendo então o adulto emergir, de modo cauteloso para impedir a queda na superfície da água (Becker et al., 2010). O desenvolvimento larvar tende a ser mais rápido nos machos, daí que a sua emergência também ocorra mais cedo que a das fêmeas (Woodbridge & Edward, 2002), permitindo a necessária rotação da genitália destes antes da emergência das mesmas. Quando esta ocorre, os adultos estão prontos para a cópula, alimentação e, no caso das fêmeas, oviposição, dando início a um novo ciclo de vida (Becker et al., 2010).

### I.1.7. Adultos

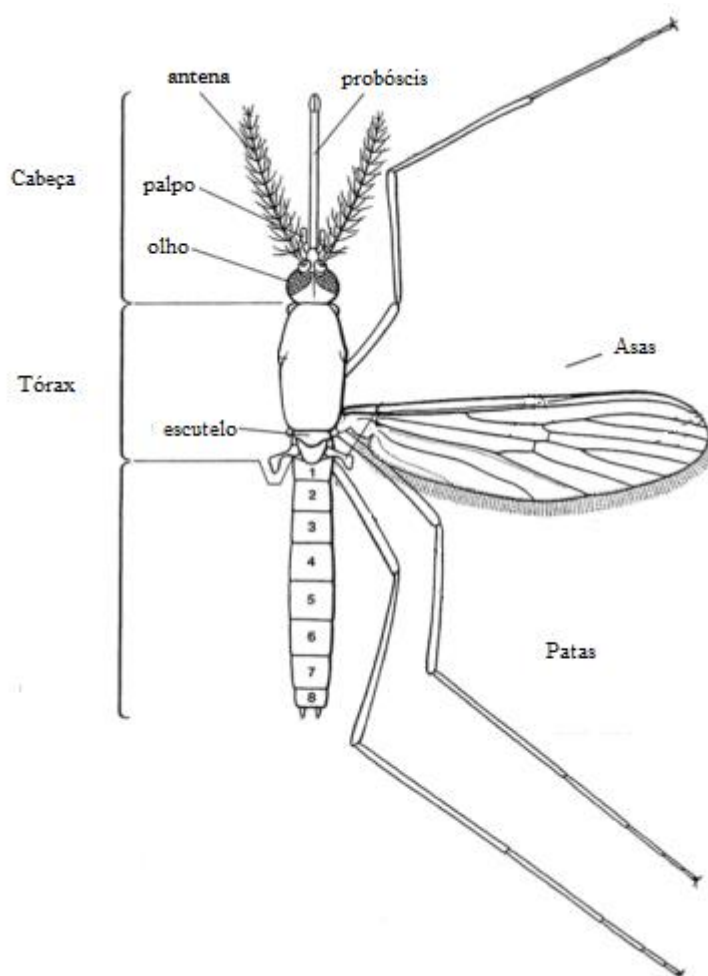
Os adultos recém-eclodidos são incapazes de fazer longos voos numa fase inicial, começando por voos curtos de alguns minutos. Durante os primeiros dias, tanto as fêmeas como os machos recorrem a néctares açucarados para obtenção de energia, necessária para processos como maturação sexual, cópula, voo e alimentação, sanguínea, no caso das fêmeas. Em praticamente todas as espécies, as refeições açucaradas sucedem durante toda a vida do adulto, em ambos os sexos (Woodbridge e Edward, 2002).

#### I.1.7.1. Morfologia do adulto

Os adultos de mosquitos são insetos de corpo e patas alongadas (Figura 4). Na cabeça encontra-se um par de olhos compostos e um par de antenas segmentadas e filamentosas, situadas entre os olhos (Service, 2012). As antenas apresentam dimorfismo sexual. Nos machos, os segmentos das antenas possuem sedas mais longas e numerosas do que nas fêmeas, atribuindo-lhes um aspeto plumoso. Já as antenas das fêmeas caracterizam-se como pilosas (Becker et al., 2010). Junto das antenas, é encontrado um par de palpos, que por sua vez apresenta variações conforme a espécie e o sexo. Nos anofelíneos, os palpos apresentam um comprimento semelhante ao do probóscis em ambos os sexos, diferindo na extremidade, que nos machos apresenta um aspeto dilatado. Quanto aos culicíneos, pelo contrário, as fêmeas apresentam um par de palpos claramente mais curtos que o probóscis. O probóscis constitui a armadura bucal, perfurante em ambos os sexos, embora apenas nas fêmeas sirva para penetrar os tecidos de vertebrados e efetuar refeição sanguínea.

O tórax encontra-se revestido por escamas, que podem ser de variadas tonalidades e que nalguns casos resulta em padrões de distinção entre espécies, como por exemplo, no caso do género *Aedes* (Service, 2012). O tórax divide-se em três segmentos: prototórax, mesotórax e metatórax, e cada segmento possui um par de patas. O par de asas membranosas, com as 2ª, 4ª e 5ª nervuras longitudinais bifurcadas e escamas em todas as nervuras e margem, está inserido no mesotórax, enquanto o metatórax apresenta um par de asas modificadas, os halteres (Service, 1993). O abdómen difere entre os

gêneros, sendo que nos culicíneos se encontra coberto de escamas, dorsal e ventralmente, enquanto nos anofelíneos se encontra praticamente desprovido destas. O abdômen é constituído por dez segmentos, embora os últimos dois não sejam visíveis em consequência da sua modificação para fins reprodutivos (Service, 2012). Os mosquitos são de pequena dimensão, atingindo entre 3-6 mm de comprimento, sendo as espécies que apresentam maior comprimento do género *Toxorhynchites* (Service, 1993)



**Figura 4** - Morfologia do mosquito adulto (culicíneo fêmea) (adaptado de Service, 2012).

### I.1.7.2. Biologia do adulto

Para a alimentação sanguínea, os adultos servem-se não só de humanos como também podem recorrer a sangue de outros animais. As espécies que preferencialmente



se alimentam de sangue humano denominam-se antropofílicas. Quando da preferência marcada por outros animais, as espécies são consideradas zoofílicas.

As fêmeas são guiadas por estímulos libertados pelo hospedeiro, integrados na respiração ou suor, como dióxido de carbono, ácido láctico, odores corporais e calor. Os mosquitos são classificados de acordo com os padrões diários de picada e locais de picada e repouso para maturação ovárica. As espécies podem ser consideradas exofágicas ou endofágicas, quando a refeição sanguínea tem lugar no exterior ou no interior, respetivamente. Por outro lado, estas podem ser denominadas espécies endofílicas ou exofílicas caso repousem preferencialmente no interior ou exterior de habitações, respetivamente.

Na natureza, o tempo de vida das fêmeas, em clima tropical, varia entre 1-2 semanas. Em climas temperados, regista-se uma maior longevidade, podendo ir até 3-4 semanas. Nos machos geralmente o tempo de vida é mais curto que o das fêmeas (Service, 2012).

### I.2. Principais métodos de controlo vetorial

O controlo vetorial é uma medida fundamental para a prevenção e controlo de doenças transmitidas por vetores (WHO, 2006). A sua implementação requer uma participação ativa por parte da comunidade, reforçando a consciencialização sobre o risco de transmissão destas doenças, a implementação de gestão ambiental e saneamento adequado. São ainda necessárias medidas para o controlo de formas imaturas e ou adultas de mosquitos. Estas consistem na eliminação de biótopos larvares e utilização de inseticidas dirigidos às formas imaturas e ou adultas, dependendo da população vetora local (Alvarez et al., 2014; Bilal et al., 2012; Cetin et al., 2004; Doucoure et al., 2014).

Os programas de controlo vetorial estão, atualmente, a inserir novas estratégias de Gestão Integrada de Vetores (*Integrated Vector Management*) para a prevenção da transmissão de doenças transmitidas por vetores (WHO, 2008). A Gestão Integrada de Vetores define-se como a implementação de várias tecnologias e gestão, combinadas ou em separado, que permitam uma melhor eficiência na supressão vetorial, de forma a

reduzir a dependência dos inseticidas e considerando sempre uma relação custo-benefício (WHO, 1983). A Gestão Integrada de Vetores pressupõe a avaliação das infraestruturas e recursos locais existentes e mediante a situação são aplicadas medidas eficientes disponíveis, podendo estas integrar o controlo químico, biológico, genético ou ecológico (WHO, 2004).

### I.2.1. Controlo biológico

Novos métodos de controlo com origem biológica têm vindo a ser utilizados baseados em bactérias (Lima et al., 2006), fungos (Scholte et al., 2005) e predadores naturais como peixes larvívoros e insetos. Os peixes larvívoros, ao alimentarem-se de larvas e pupas de mosquitos, contribuem para um decréscimo da futura população adulta (Walshe e Garner, 2013). No entanto, fatores ambientais como períodos de chuvas intensas ou alterações de marés limitam a sua eficácia no controlo vetorial (Carlson e Vigliano, 1985).

Os biocidas foram desenvolvidos como alternativa aos inseticidas e larvicidas de origem química, não só para combater o aparecimento de resistências, mas também para um melhor controlo a nível ambiental e de poluição (Fillinger et al., 2003). As bactérias entomopatogénicas têm-se mostrado eficientes no controlo de dípteros, sendo utilizadas como base de biolarvicidas (Lacey, 2007). A utilização de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e *Lysinibacillus sphaericus* (= *Bacillus sphaericus*, Bs) como biolarvicidas para larvas de culicíneos e anofelíneos tem vindo a aumentar como medida de controlo biológico. Contrariamente aos inseticidas químicos, há uma fraca probabilidade de desenvolvimento de resistências face ao uso de Bti (Dambach et al., 2014). No entanto, e no caso de Bs, já foi registado o aparecimento de resistências por algumas populações de mosquitos (Nielsen-Leroux et al., 2001). Tanto o Bti como o Bs se mostraram altamente eficazes como larvicidas, em alternativa à utilização de inseticidas químicos sintéticos em estratégias de controlo vetorial. Embora o Bs se restrinja a certas espécies de mosquitos, provou ter uma grande capacidade de atuação em águas poluídas, tendo assim contribuído especialmente para o controlo de várias espécies do género *Culex* (Wirth et al., 2010). O potencial dos larvicidas baseados em Bti, e mais

recentemente em Bs, deve-se a uma série de fatores, sendo os mais relevantes a segurança, a eficiência e a relação custo-benefício. Os produtos criados através de Bti e Bs provaram ser mais eficientes em relação ao custo quando comparados com inseticidas químicos, tornando-os assim uma forte alternativa a estes inseticidas. O facto de não provocarem danos ambientais contribui também para uma maior adesão a estes produtos. Foi comprovado que não apresentam qualquer ameaça para humanos e outros vertebrados, já que possuem uma alta especificidade em relação aos seus alvos, e ainda assim praticamente não afetam outros insetos e invertebrados que coabitem os mesmos locais que os alvos em questão. Não só causam consideravelmente menos danos no ambiente que os inseticidas químicos, como o modo de atuação também é diferente, na medida em que enquanto os inseticidas químicos atuam através de neurotoxinas ou mecanismos de inibição, estes biocidas destroem seletivamente o trato intestinal do inseto. Estes fatores contribuíram para a integração de produtos derivados de Bti e Bs em programas de controlo vetorial, visando ainda minimizar o desenvolvimento de resistências a inseticidas químicos (WHO, 1999).

### I.2.2. Controlo químico

Programas de controlo vetorial incluem técnicas tanto para o controlo de adultos como das formas imaturas (Joseph et al., 2004). Estas técnicas têm como base inseticidas químicos. Contudo, há uma lista de fatores que condicionam a utilização destes inseticidas, tais como o impacto negativo a nível ambiental, os danos causados em outras populações que não a população alvo do inseticida e o aumento da resistência por parte dos vetores a estes produtos (Kumar et al., 2014).

Atualmente, para o controlo dos adultos, os programas têm-se baseado sobretudo nos inseticidas químicos, que podem ser utilizados em forma de pulverização de inseticidas de efeito residual no interior de habitações (*IRS- Indoor Residual Spraying*) ou o uso de redes mosquiteiras impregnadas com inseticida (*ITN- Insecticide Treated Bednets*) (Trudel e Bomblies, 2011). O uso de redes mosquiteiras impregnadas com inseticida e de pulverização inseticidas possuem um papel primário em estratégias de

controle direcionadas a mosquitos em fase adulta, graças à sua eficácia e por serem de fácil acesso em termos financeiros.

Para a formulação de inseticidas pulverizáveis, estão aprovadas quatro classes de produtos, sendo essas os piretróides, organoclorados, organofosfatos e carbamatos. Entre estas quatro classes, apenas os piretróides são aprovados para a aplicação em redes mosquiteiras impregnadas com inseticidas (WHO, 2012). Tendo em consideração a vasta e intensiva utilização dos mesmos em estratégias de controle vetorial, é prioritário monitorizar periodicamente a suscetibilidade dos vetores face a estes inseticidas e proceder à identificação e avaliação dos mecanismos de resistência, para que numa abordagem futura se considerem essas limitações (Abdalla et al., 2014).

### I.2.3. Controlo genético

Novas técnicas de engenharia genética têm permitido avanços no controlo vetorial. Uma dessas técnicas corresponde a Técnica de Insetos Estéreis (*SIT – Sterile Insect Technique*), que consiste na produção em massa e posterior libertação de insetos estéreis da espécie alvo em habitats naturais da mesma. A cópula entre machos estéreis e fêmeas da população local vai induzir uma redução na taxa de reprodução, que por sua vez poderá levar à erradicação da espécie localmente (Alphey e Andreasen, 2002).

Para além da metodologia *SIT*, também tem vindo a ser desenvolvida uma nova estratégia baseada em modificações genéticas transmissíveis, recorrendo à inserção de novos genes no organismo do mosquito que induzem a redução da competência vetora da espécie. Os mosquitos modificados são então integrados na população alvo local, conduzindo a cópula entre indivíduos modificados e indivíduos desta à disseminação destes genes. Este tipo de estratégia possui mais do que um método de atuação. Uma das alternativas foca-se no tipo de modificação inserida nos mosquitos, podendo esta consistir na introdução de um ou mais genes no genoma do inseto (Marois et al., 2012). Outros métodos de atuação podem focar-se na redução do número de fêmeas de mosquitos, na redução da longevidade ou da capacidade de sobreviver à infeção e transmitir o agente patogénico. Este tipo de abordagem só é eficaz se for realizada frequentemente, já que

estas modificações tendem a desaparecer da população. Para evitar este declínio, é necessário proceder a repetidas libertações de insetos modificados, até ser possível observar efeitos com significado epidemiológico (Burt, 2014)

### I.3. Inseticidas

Os inseticidas sintéticos podem pertencer a quatro grupos principais: organoclorados, organofosfatos, carbamatos e piretróides (Karunaratne et al., 2013). Não obstante os bons resultados sobre os mosquitos vetores, a utilização continuada destes inseticidas tornou-se prejudicial, na medida em que afeta outros organismos que não as espécies alvo e leva à acumulação de substâncias tóxicas nos ecossistemas, e induz o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte das espécies alvo (Bansal et al., 2011).

O DDT foi o primeiro inseticida químico proveniente de organoclorados a ser introduzido no mercado. O seu uso foi fundamental na campanha de erradicação da malária pela Organização Mundial de Saúde (OMS), entre 1955-1969, e ainda é utilizado no controlo da malária atualmente. Embora tenha sido retirado da agricultura, pela resistência desenvolvida pelos insetos e pela sua perseverança no ambiente, continua a ser utilizado em controlo dos mosquitos, pela sua relação custo-benefício e eficácia em pulverização (Coleman e Hemingway, 2007). Ainda para o controlo de malária, foi adotado o uso de piretróides. São utilizados em forma de pulverização de efeito residual e são a única classe de inseticidas recomendada pela OMS para a impregnação em redes mosquiteiras. O DDT e seus análogos, bem como os piretróides, atua ao nível dos canais de sódio das membranas nervosas do mosquito (Lima et. al, 2011). Os inseticidas derivados de organofosfatos, como o temephos, e carbamatos possuem tambémum mesmo mecanismo de ação, ligando-se ao enzima acetilcolinesterase na junção nervosa. Os organofosfatos e carbamatos são aplicados na forma em pulverização de efeito residual, sendo o temephos utilizado como larvicida. Enquanto para larvicidas estão disponíveis várias classes de químicos, a recomendação para a formulação de inseticidas residuais pulverizáveis está restringida apenas a estas classes (Coleman e Hemingway, 2007).

A aplicação incorreta de inseticidas, a utilização excessiva dos mesmos ou o contacto com determinados fatores ambientais são algumas das ações que podem contribuir para a emergência de mecanismos de resistência. O facto de a população de mosquitos vetores se ter vindo a multiplicar à medida que vão surgindo mecanismos de resistência torna ainda mais urgente o desenvolvimento de novos métodos e produtos para uso em controlo vetorial (Blayneh e Mohammed-Awel, 2014).

### I.4. Larvicidas

Considerar o estado larvar como alvo do controlo vetorial revela-se uma melhor alternativa em determinadas situações, dada a restrição das áreas onde as larvas se encontram, a sua pouca mobilidade comparativamente ao estado adulto e o facto de não haver alteração comportamental como modo de fuga aos inseticidas, ao contrário do que se pode observar em mosquitos adultos (Mdoe et al., 2014). Quando a aplicação de larvicida é eficaz, interrompe o ciclo de vida do mosquito logo na fase inicial, o que a caracteriza como uma medida de controlo a longo prazo (Anogwih et al., 2015).

A utilização de larvicidas surge incorporada em vários programas de Controlo Integrado de Vetores, como o controlo de malária e de arboviroses (WHO, 2011). Várias técnicas de controlo vetorial são complementadas com o uso de larvicidas, como por exemplo a gestão ambiental, em que os larvicidas são aplicados em diferentes habitats, tanto em áreas urbanas como em zonas mais rurais, onde os biótopos larvares estão bem identificados (Djènontin et al., 2014).

Denomina-se Gestão de Biótopos Larvares (*LSM- Larval Source Management*) a gestão de potenciais biótopos larvares, com o intuito de impedir que haja desenvolvimento de formas imaturas. Para tal, são implementadas estratégias para este fim como a implementação de alterações permanentes nos habitats dos mosquitos e a manipulação dos habitats, através da prática de atividades que impeçam o desenvolvimento dos vetores. Outra estratégia remete para o controlo biológico, através da implementação de medidas como aplicação de larvicidas e introdução de predadores naturais nos biótopos larvares (WHO, 2013a).

Os principais larvicidas dividem-se em cinco grupos: óleos, químicos, larvicidas bacterianos, spinosade e reguladores de crescimento.

### I.4.1. Óleos e películas de superfície

A aplicação de óleos e películas de superfície vai provocar a desregulação da tensão superficial, que impede as larvas de acederem à superfície para respirar, resultando na sua morte por falta de oxigénio. Este método mostrou-se eficiente como larvicida, porém o seu efeito alastrou-se a outros invertebrados aquáticos que por sua vez também recorrem a superfície da água para respirar ou para a oviposição. Além disso, alguns fatores ambientais podem interferir com a sua aplicação, como o vento ou vegetação que pode absorver os óleos.

Dentro do controlo larvar, a aplicação de óleos nos biótopos larvares caracteriza-se como um dos métodos mais antigos. No entanto, sendo um dos larvicidas de maior custo, com persistência limitada e induzindo prejuízos ambientais, a sua utilização é diminuta ou nula (WHO, 2013a).

### I.4.2. Larvicidas químicos

Na década de 1940 foram descobertos os inseticidas derivados de organoclorados, que seguidamente foram utilizados para controlo larvar. No entanto, na década de 50, desencadeou-se o aparecimento de resistência (WHO, 1997), o que levou à retirada destes compostos do controlo larvar. Além da resistência, o facto de estes químicos permanecerem por longos períodos no solo e em tecidos animais e vegetais também levou a que não sejam reconhecidos como larvicidas recomendados (WHO, 2013a).

Os organofosfatos atuam como larvicida ao provocar a inibição do enzima Acetilcolinesterase (AChE). Acetilcolinesterase é uma esterase responsável pela hidrolisação da enzima acetilcolina, que por sua vez integra a regulação da transmissão nervosa. A inibição de AChE vai resultar num aumento de concentração de acetilcolina, induzindo paralisia no inseto (Becker et al., 2010). Estes químicos orgânicos sintéticos

perduram menos tempo no ambiente em comparação com os inseticidas organoclorados, sendo por isso recomendados pela OMS (WHO, 1997).

O organofosfato temephos é um larvicida bastante utilizado em programas de controlo, como no Programa de Controlo da Oncocercose na África Ocidental contra larvas de simulídeos, e em programas de controlo de dengue, contra larvas de *Aedes aegypti* (WHO, 2013a).

Os piretróides não são considerados para controlo larvar, pois além de se apresentarem tóxicos para outros organismos aquáticos, como peixes, são mais suscetíveis de serem alvo de resistência (WHO, 1982).

Os larvicidas químicos atuam de maneira rápida e podem ser aplicados facilmente em locais de pequena escala. No entanto, a sua aplicação tem de ser renovada frequentemente, e por vezes podem ser prejudiciais para organismos não alvo presentes no biótopo larvar, nomeadamente os predadores naturais das larvas. Além disso, a toxicidade dos larvicidas pode afetar inclusive humanos, daí a sua utilização requerer uma manutenção cuidadosa (WHO, 2013a).

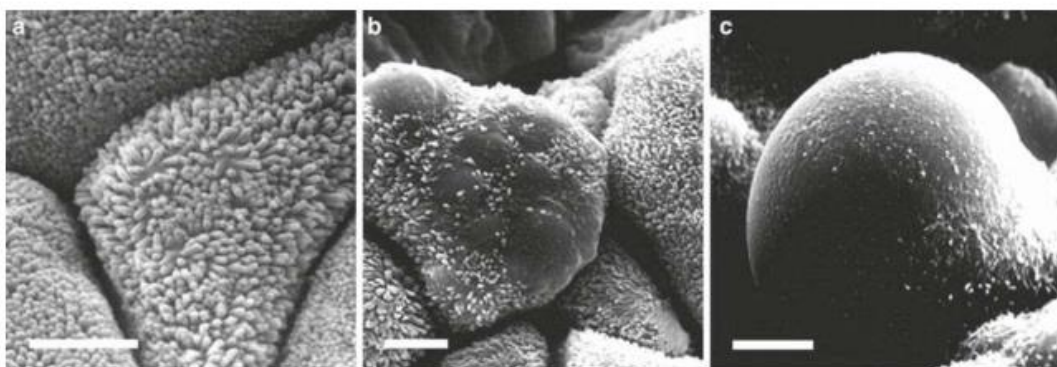
### I.4.3. Biocidas

Em estratégias de controlo biológico são utilizados vários produtos provenientes de microrganismos com capacidade a atuar contra os insetos, tais como fungos, nemátodes e bactérias (Rajesh et al., 2015).

As bactérias *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e *Lysinibacillus sphaericus* (Bs) são bactérias aeróbias e Gram-positivas que durante a esporulação produzem endotoxinas, também designadas por proteínas cristal. Estas toxinas apresentam propriedades inseticidas que são a base de várias formulações larvicidas. Quando os cristais são ingeridos pela larva, a sua solubilização com libertação das endotoxinas é promovida pelo meio ácido do intestino e, pela ação de enzimas presentes, ocorre a sua ativação e ligação a recetores específicos das células do epitélio intestinal. A aderência destas proteínas à membrana das células epiteliais leva à formação de poros transmembranares através dos quais a entrada de água e a saída de iões ou outros componentes induzem a turgescência



das células, resultando na lise das mesmas (Regis et al., 2001). Nesta fase, as larvas tornam-se inativas e deixam de alimentar-se, sendo facilmente predadas e podendo morrer ainda por inanição. Por sua vez, a lise celular e consequente disrupção do epitélio intestinal promovem a dispersão de conteúdo celular, sucedida pela germinação de esporos da bactéria. Esta multiplicação bacteriana pelo organismo da larva vai gerar uma septicemia severa, que acabará por resultar na morte da mesma (Bravo et al., 2007). Este mecanismo geral de ação é partilhado pelas diferentes estirpes de *Bacillus thuringiensis* e por *Lysinibacillus sphaericus*, no entanto, as endotoxinas presentes em cada caso são diferentes conduzindo à elevada especificidade destes biocidas.



**Figura 5** – Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis israelensis*: a) epitélio intestinal de uma larva *Aedes aegypti* saudável; b) epitélio intestinal após 30 minutos da ingestão das proteínas cristal; c) célula prestes a sofrer lise celular (adaptado de Becker et al., 2010).

A utilização destes larvicidas mostrou-se vantajosa na medida em que não afeta outros organismos, é seguro aplicá-los em diversos habitats e em água potável, são de aplicação rápida e mostraram-se uma alternativa eficaz para zonas onde as larvas apresentam resistência a larvicidas químicos. No entanto, são de duração mais curta que os larvicidas químicos, daí requererem aplicações repetidas para serem eficazes. Além disso, é necessário os larvicidas estarem presentes durante o período de alimentação das larvas para serem ingeridos e atuarem no seu organismo. Caso as larvas já se encontrem no quarto estágio larvar tardio, no qual cessam a alimentação, o larvicida não terá a mesma eficiência (WHO, 2013a). Assim, torna-se necessária a monitorização do desenvolvimento larvar no planeamento de aplicações sucessivas de Bti e Bs.

### I.4.4. Espinosinas

A fermentação por parte da bactéria *Saccharopolysora spinosa* dá origem aos metabolitos designados por espinosinas. Estes metabolitos vão dar origem ao espinosade, que tem como alvo os recetores de acetilcolina (Perry. et al., 2011). As espinosinas, quando utilizadas corretamente, apresentam níveis muito baixos de toxicidade para mamíferos, peixes e pássaros, podendo ser aplicadas em vários tipos de habitats, incluindo água potável. Porém, podem ser tóxicas para alguns invertebrados aquáticos e outros artrópodes. Embora em algumas espécies de mosquito já tenham sido detetados níveis de resistência, continua a representar uma alternativa aos inseticidas químicos. No entanto, não são tão específicos como os larvicidas bacterianos, sendo até utilizados para programas de controlo de pestes na agricultura (WHO, 2013a).

### I.4.5. Reguladores de crescimento de insetos

Os reguladores de crescimento são diferenciados em dois grupos: hormonais e não hormonais. Os reguladores hormonais são considerados análogos às hormonas juvenis, evitando o desenvolvimento de larvas e pupas para adultos. Neste grupo encontram-se compostos como metopreno e piriproxifeno (WHO, 2013a). O mecanismo de ação do piriproxifeno tem como alvo a fisiologia da morfogénese, embriogénese e reprodução (Kawada et al., 1988). Os reguladores não hormonais atuam como inibidores da síntese de quitina, atuando aquando da metamorfose da larva e induzindo a sua morte.

Em comparação a outros larvicidas, o efeito residual dos análogos às hormonas juvenis é mais longo, sendo que o intervalo de tempo para reaplicar o produto é maior. Já os inibidores da síntese de quitina requerem uma re-aplicação mais frequente. O efeito destes larvicidas pode apresentar maior durabilidade quando estes são aplicados na forma de grânulos ou microcápsulas em habitats específicos. Em doses baixas, não apresentam qualquer tipo de toxicidade para mamíferos, pássaros e insetos adultos. No entanto, quando aplicados em excesso, por má manutenção, podem ser prejudiciais para imaturos de outros invertebrados aquáticos e até alguns crustáceos. No caso dos reguladores hormonais, estes exigem esquemas de monitorização mais rigorosos que os restantes

inseticidas pois o impacto do seu efeito só é observado após a emergência do adulto, o que obriga a uma monitorização de resultados durante um maior intervalo de tempo (WHO, 2013a).

### I.5. Mecanismos de resistência

Dentro das populações de mosquitos vetores, e quando sujeitos a controlo, os indivíduos que manifestam resistência aos inseticidas apresentam maior sobrevivência que os mosquitos desprovidos da mesma. Deste modo, são os genes resistentes que se transmitirão pelas gerações futuras, ocorrendo acréscimo da sua frequência na população, o que origina falhas dos programas de controlo vetorial quando exclusivamente baseados na aplicação de um inseticida. É fundamental compreender os mecanismos de resistência para travar ou prevenir a sua propagação e permitir a criação de novos inseticidas eficazes contra espécimes resistentes (Karunaratne et al., 2013).

Um dos principais obstáculos no controlo vetorial encontra-se na resistência aos inseticidas, na medida em que esta pode atuar de diferentes formas. São considerados dois mecanismos de resistência de maior relevância para os inseticidas químicos: resistência metabólica e resistência por modificação dos sítios alvo.

Na resistência metabólica, as enzimas detoxificantes sofreram uma alteração que lhes permite uma detoxificação do inseticida mais rápida do que o normal, impedindo-o de atingir o local de ação e, assim, de atuar sobre o organismo. As enzimas que integram este mecanismo de resistência designam-se por esterases, oxidases de função mista (Citocromo P450) e Glutaciona-S-transferases (WHO, 2013b).

As oxidases de função mista, mais concretamente Citocromo P450, pertence a um grupo de enzimas oxidativas que conferem resistência sobretudo a piretróides e carbamatos, e também a organoclorados e organofosfatos mas não de uma forma tão extensa. As esterases são responsáveis pela resistência a organofosfatos e piretróides, mas de uma forma menos acentuada. As glutaciona-S-transferases estão relacionadas com a resistência a DDT, piretróides e organofosfatos (Coleman e Hemingway, 2007).

A resistência de modificação do sítio alvo define-se pela alteração do centro ativo das proteínas alvo dos inseticidas, graças a uma mutação. Desta forma, o inseticida é incapaz de afetar, ou afeta o inseto com menor gravidade. Para o DDT e os piretróides este tipo de resistência incide sobre os recetores dos canais de sódio, dando origem ao que se descreve como resistência *knockdown* (WHO, 2013b). A mutação que dá origem a esta resistência resulta habitualmente na substituição de um aminoácido leucina para uma fenilalanina na sequência de ADN dos canais de sódio, nomeadamente na região IIS6 (Paeporn et al., 2007). Também a proteína neurotransmissora acetilcolinesterase (AChE) pode sofrer a mutação que dá origem à resistência AChE-1, que vai bloquear o efeito de inseticidas das classes carbamatos e organofosfatos.

Estes mecanismos de resistência podem ser complementados com casos de resistência cruzada, que incide sobre inseticidas que tenham o mesmo modo de ação. No caso de mosquitos com a mutação que confere a resistência *knockdown*, estes podem apresentar resistência não só a piretróides como a DDT. Também os que possuem a resistência AChE-1, podem adquirir resistência tanto a carbamatos como a organofosfatos. Aquando da escolha do inseticida esta será sempre condicionada se for detetada resistência cruzada, que acaba por limitar a ação dos mesmos (WHO, 2013b).

## **II. Objetivos**

## II. Objetivos

Este estudo visou analisar a capacidade biocida, como larvicida, de um produto natural, nomeadamente o secretoma de uma estirpe bacteriana pertencente à Família *Pseudomonadaceae*, através de testes de sensibilidade realizados com larvas de mosquitos das espécies *Culex theileri* Theobald, 1903 e *Anopheles atroparvus* van Thiel, 1927.

Os objetivos definidos para este estudo foram:

- A) Analisar a ocorrência de mortalidade de imaturos sujeitos ao produto e a relação dose-mortalidade;
- B) Identificar possíveis alterações morfológicas causadas pelo produto.

A primeira etapa deste estudo consistiu na realização de ensaios de sensibilidade das espécies ao produto bacteriano, para com base nos resultados analisar o potencial larvicida do secretoma, em diferentes concentrações.

A segunda fase do estudo centrou-se na observação das larvas expostas ao produto, e das larvas de controlo, por microscopia ótica. Esta etapa teve como objetivo a análise de possíveis alterações morfológicas nas larvas causadas pelo produto. Em função dos órgãos larvares que apresentassem eventuais alterações, poder-se-iam formular hipóteses sobre qual o mecanismo de ação responsável pelas referidas modificações.

## **III. Materiais e Métodos**

### III. Materiais e Métodos

#### III.1. Manutenção da colónia de mosquitos *Culex theileri* e *Anopheles atroparvus*

As colónias de *Culex theileri* Theobald, 1903 e *Anopheles atroparvus* van Thiel, 1927 foram mantidas em insetário em condições controladas, designadamente a uma temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , humidade relativa de  $70\pm 10\%$  e um fotoperíodo alternado de luz/escuro.

Os adultos foram conservados numa gaiola *stock*, onde era colocada uma tina com água desclorada para as posturas, substituída diariamente. A água desclorada foi obtida através de água da torneira mantida em garrações e só utilizada após 48 horas de evaporação. A alimentação foi feita à base de uma solução aquosa de açúcar a 10%, previamente preparada e absorvida em papel de filtro, de modo a facilitar a alimentação dos mosquitos. A solução açucarada foi garantida diariamente, excetuando o dia anterior à alimentação sanguínea, quando era retirada para impedir que as fêmeas estivessem saciadas. A alimentação sanguínea teve lugar uma vez por semana, recorrendo-se a *Ratus norvegicus*, estirpe *Wistar*, provenientes do Biotério do IHMT, que eram previamente anestesiados. A anestesia era administrada por injeção interperitonal com uma solução combinada de xilazina (Rompun® 2%, Bayer, Canadá) e quetamina (Imalgene® 1000, Merial, Portugal), na proporção adequada à espécie e peso do animal (Hedenqvist & Hellebrekers 2003). A manipulação destes animais foi supervisionada e efetuada de acordo com as normas do Conselho da Comunidade Europeia de 24 de novembro de 1986 (86/609/EEC) e legislação nacional em vigor (Decreto-lei 129/92 de 2 de junho, Portaria n°100/92 de 23 de outubro).

As posturas e os imaturos foram mantidos em tinas de plástico com água desclorada, cobertas com tule. No caso de *Cx. theileri*, as posturas eram divididas por tinas numa quantidade de 6-7 posturas por tina, com o objetivo de se obter uma densidade larvar apropriada. Com o mesmo objetivo, os ovos de *An. atroparvus*, que são postos isolados, eram distribuídos em número aproximadamente igual pelas tinas de criação. Diariamente, as larvas *Cx. theileri* eram alimentadas com comida para alevins Sera®



Micron e as larvas *An. atroparvus* com uma mistura de flocos moídos para peixe Tetra® Menu e Bolacha Maria na proporção de 4:1. Os exemplares mortos eram diariamente retirados das tinas. No último dia de cada semana, os imaturos eram colocados em tinas novas e as pupas recolhidas e colocadas na gaiola de eclosão, de menor tamanho que a gaiola *stock*. Nesta gaiola era também colocado um frasco de solução 10% de sacarose, para os adultos eclodidos durante o fim-de-semana. Os adultos eclodidos nas tinas eram coletados diariamente para a gaiola *stock*, à exceção do dia anterior à refeição sanguínea, em que eram colocados na gaiola de eclosão e só no dia seguinte eram transferidos para a gaiola *stock*.

#### III.2. Preparação do secretoma bacteriano

O pré-inóculo da bactéria foi iniciado num volume de 20 mL em meio Mg [1x] e deixado a crescer *overnight*. Posteriormente, foi transferido para um balão de maior volume (3 L) e colocado na estufa durante 24 horas. Após 24 horas, o meio bacteriano foi dividido por recipientes, numa quantidade de 200 mL e estes foram posicionados na centrífuga Beckman JS2-21, seis recipientes por centrifugação. A centrifugação teve uma duração de dez minutos a 21°600 g. Posteriormente foram recolhidos e foi coletado o sobrenadante que foi então sujeito a filtração por vácuo com um filtro de 0,22 µm, impedindo a passagem de qualquer bactéria eventualmente em suspensão. Quando já todo o sobrenadante tinha sido filtrado, foram realizadas as diluições do produto original para as concentrações a testar. Para o controlo negativo de alguns ensaios foi utilizado meio Mg [1x] estéril, sem glucose. As diluições foram preparadas com sobrenadante e meio estéril sem glucose.

#### III.3. Análise do efeito larvicida do secretoma bacteriano

O estudo do efeito larvicida do secretoma bacteriano consistiu na exposição de larvas ao produto bacteriano e na análise dos valores de mortalidade após 24 horas. Os ensaios foram feitos com larvas de uma ou duas das espécies, *Cx. theileri* e *An.*

*atroparvus*, consoante a disponibilidade de larvas, condicionada pelo estado das colónias. Estas encontravam-se no final do estágio L3 ou início do estágio L4, doravante designadas por “L3-L4”, e não foram alimentadas durante o período do teste. Em cada ensaio foram feitas réplicas por concentração, que variaram entre duas a quatro, dependendo da disponibilidade de larvas L3-L4 à data de realização de cada um deles. Também em função dessa disponibilidade, o número de larvas por tina foi de 15 ou 25, fixo em cada um dos ensaios. A realização destes teve lugar em Insetário, decorrendo a temperatura de  $25\pm 2$  °C, humidade relativa de  $70\pm 10$  % e com um fotoperíodo alternado de 12h claro/12h escuro.

Em ensaios preliminares, anteriores a este trabalho, foi identificada uma diluição de secretoma que induziu 100% de mortalidade em *An. atroparvus*. A quantidade de secretoma presente nessa diluição foi utilizada como referência neste trabalho, sendo o produto biológico a testar sempre fornecido nessa concentração, a que se convencionou designar por “concentração 100%”.

#### III.3.1. Ensaios com secretoma bacteriano liofilizado

Nos ensaios I, II, III e IV foi testado secretoma bacteriano liofilizado e ressuspendido. Para cada ensaio foi utilizado um lote de produto biológico específico, conforme descrito em III.2. Para tal, foram coletadas larvas de *Culex theileri* (Ensaio I, II, III e IV) e larvas de *Anopheles atroparvus* (Ensaio IV), e colocadas em tinas com 250 mL (Ensaio I), 200 mL (Ensaio IV) e 100 mL de água (Ensaio II e III). Os resultados foram lidos e registados nas 24 horas seguintes. Nos registos foram enumerados os exemplares vivos e mortos de cada fase do ciclo de vida. Nos ensaios I e II foram testadas quatro concentrações de produto nomeadamente de 0, 25%, 50%, 75% e 100%, em que zero correspondeu ao controlo negativo e 100% à maior concentração de produto. O lote correspondente ao Ensaio III foi testado num leque mais alargado de concentrações, de 0, 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 50%, 65% e 100%. Os controlos negativos dos ensaios foram água desclorada. Para o Ensaio IV, foram coletadas larvas L3-L4 de *Cx. theileri* e *An. atroparvus*, e as concentrações testadas foram consideravelmente mais baixas que as

anteriores. Para os ensaios com *An. atroparvus* foram testadas concentrações de 2%, 4%, 5% e 7%. Para *Cx. theileri* foram ligeiramente maiores, nomeadamente de 10%, 12,5%, 15% e 20%. Os controlos, para ambas as espécies, foram realizados com água desclorada e com meio estéril.

Para os ensaios com secretoma bacteriano liofilizado, as ampolas contendo o produto a testar foram descongeladas no frio, recorrendo ao uso do vórtex para homogeneização da ressuspensão. Antes da aplicação do produto, foi retirado das tinas o volume correspondente a cada dose a aplicar, para perfazer o volume final de 100, 200 ou 250 mililitros, conforme o ensaio. Os ensaios foram feitos em água desclorada.

#### III.3.2. Ensaios com secretoma bacteriano filtrado

Os ensaios V e VI consistiram em testar o meio bacteriano filtrado, contendo o secretoma não liofilizado. Para tal, foram coletadas larvas L3-L4 de *Culex theileri* e *Anopheles atroparvus* e colocadas em tinas com 200 mL de meio estéril, sem alimentação. Mais uma vez, os resultados foram lidos e registados após 24 horas. O produto bacteriano, obtido conforme descrito em III.2, foi previamente diluído em meio estéril sem glucose. Para o Ensaio V as diluições preparadas foram de 25%, 50%, 75% e 100% para ambas as espécies. No Ensaio VI, as larvas de *Cx. theileri* foram expostas a concentrações de 5%, 10%, 25% e 50% e as larvas de *An. atroparvus* a 5%, 10%, 15% e 20% de produto bacteriano. Para ambos os ensaios foram preparados dois controlos negativos, um contendo água desclorada e outro com meio estéril. Na figura 6 está representado o ensaio VI, com larvas de *Cx. theileri*.



**Figura 6** - Aspecto geral de ensaio para testar a acção larvicida, com o Ensaio VI com larvas de *Cx. theileri*, em meio bacteriano filtrado. Neste exemplo são utilizadas tinas de 200 mL de capacidade e 25 larvas por tina, com dois controlos negativos e quatro concentrações (5%, 10%, 25%, 50%) (Fotografia da autora).

#### III.3.3. Ensaio com fração

Posteriormente a estes ensaios, foi ainda testada uma fração com compostos do secretoma com massa molecular inferior a 20 kDa. Primeiramente, foi realizado um ensaio preliminar com fração em concentração equivalente à existente na concentração 100% de secretoma total. Para tal foram feitas 3 réplicas, cada uma com 15 larvas de *Cx. theileri* e para controlo negativo foi utilizado meio de cultura estéril.

No ensaio com fração em concentração de 5 g/L foram testadas em larvas L3-L4 de *An. atroparvus*, sem alimentação, nas concentrações de 30%, 60% e 100%, diluídas em água desmineralizada, num volume total de 250 mL. Para controlos negativos recorreu-se a água desmineralizada e água desclorada. Os resultados de ambos os ensaios foram lidos e registados após 24 horas.

#### III.4. Análise e apresentação de dados

Os dados coletados nos ensaios foram organizados recorrendo ao programa Excel (Microsoft 2013). Foram registados diariamente o número de imaturos, vivos e mortos, em função das várias concentrações testadas. Foi calculada a média de mortalidade larvar às 24 horas, e respetivo desvio padrão, relativamente a cada concentração de larvicida

utilizada em diferentes ensaios. Foi sempre excluído o número de pupas às 24 horas do número total de imaturos, e os valores foram representados num gráfico de barras.

#### III.5. Montagem das larvas

As larvas vivas e mortas obtidas dos ensaios anteriores foram conservadas em etanol a 80%, juntamente com as pupas em tubos individualizados por concentração e ensaio. Para a observação das larvas ao microscópio ótico, procedeu-se à sua montagem prévia entre lâmina e lamela. Para isso, utilizou-se o meio polivinil-cloral-formo-fenol (PCFF) (Ribeiro, 1962), colocando-o em pequena quantidade na lâmina. Em seguida, com o auxílio de duas agulhas, as larvas foram colocadas no meio. Com o auxílio de uma pinça, a lamela foi colocada sobre as larvas de maneira a evitar a presença de bolhas de ar. Por cada concentração foram observadas 10 larvas, vivas e mortas, e em cada lâmina montaram-se entre duas a três larvas. Este procedimento realizou-se com recurso ao estéreomicroscópio Olympus SZ61. As preparações foram observadas ao microscópio ótico Olympus BX51, tendo as fotografias sido obtidas através de câmara Olympus SC30 acoplada e programa “analySIS getIT” a uma ampliação de 400x.

## **IV. Resultados e Discussão**

## IV. Resultados e Discussão

### IV.1. Potencial larvicida do secretoma bacteriano

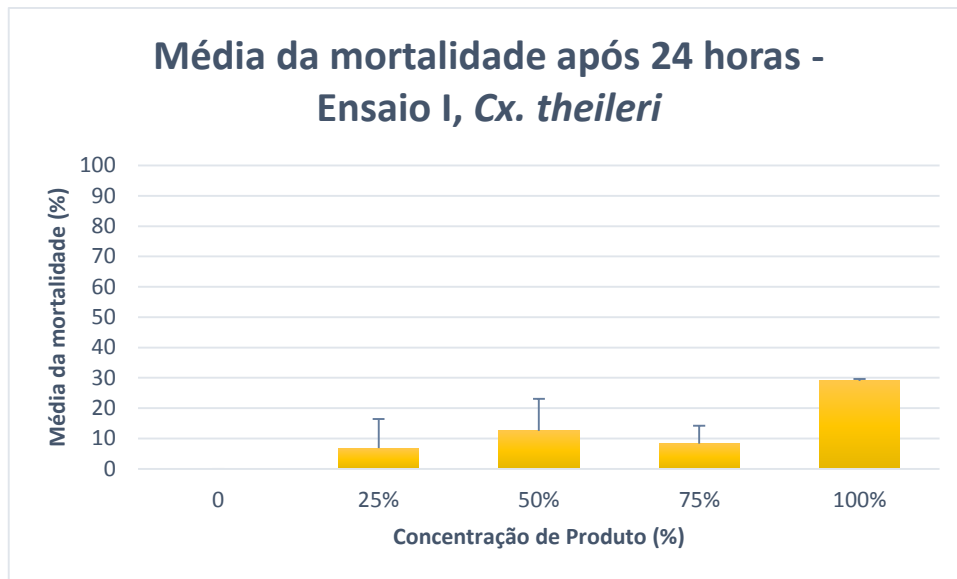
#### IV.1.1. Ensaios com secretoma bacteriano liofilizado

Numa primeira fase, procedeu-se à análise de quatro lotes de produto biológico, que foram testados em larvas de *Cx. theileri*, nos ensaios I, II e III, e em *Cx. theileri* e *An. atroparvus* no ensaio IV. Os ensaios foram acompanhados às 24 horas seguintes e os imaturos foram coletados para posteriormente serem observados ao microscópio ótico.

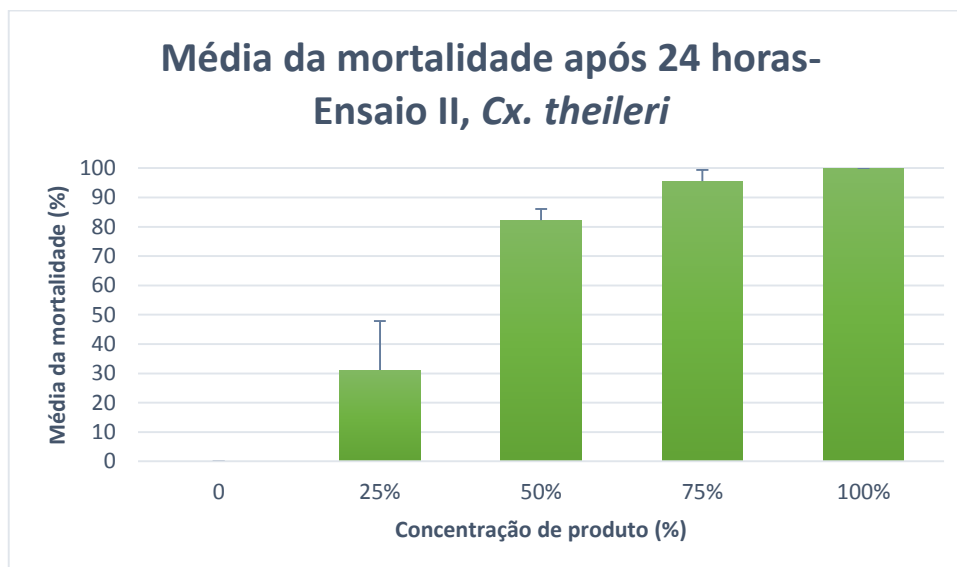
Nos ensaios I e II o secretoma foi testado nas concentrações de 25%, 50%, 75% e 100%. No primeiro ensaio, verificou-se mortalidade das larvas após 24 horas em todas as concentrações testadas (Figura 7). Embora a mortalidade média correspondente à concentração de 25% seja a mais baixa e a de 100% a mais elevada, a concentração de 75% obteve uma mortalidade média inferior à concentração de 50%, além de que esta registou também o maior valor de desvio padrão.

No ensaio II, cujos resultados se apresentam na Figura 8, após 24 horas houve um aumento gradual da mortalidade com a concentração, tendo-se registado 100% de mortalidade na concentração máxima de secretoma (100%). O desvio padrão da mortalidade na concentração de 25% foi o mais elevado.

Nos gráficos correspondentes aos resultados dos ensaios I (Figura 7) e II (Figura 8), é visível um resultado mais coerente por parte do ensaio II, em que a média de mortalidade cresce gradualmente com o aumento de concentração. No entanto, embora tenham sido testadas as mesmas concentrações em ambos os ensaios, as mortalidades obtidas não são semelhantes, sendo as do ensaio I inferiores às do ensaio II.



**Figura 7** - Mortalidade após 24 horas no Ensaio I, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão, para 2 réplicas por concentração, de 25 larvas cada.



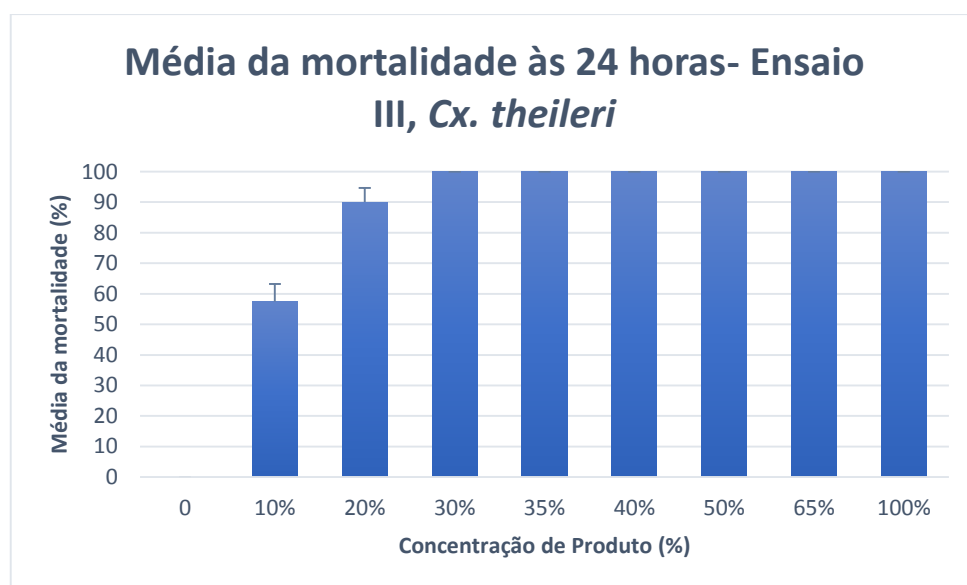
**Figura 8** - Mortalidade após 24 horas no Ensaio II, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão, para 3 réplicas por concentração, de 15 larvas cada.

Para o ensaio III, a gama de concentrações utilizadas foi mais vasta que as anteriores. Ao testar novas concentrações pretendeu-se atingir resultados que cumprissem os requisitos definidos por WHO (2005). Estes ditam que para a determinação da reta de regressão de probit mortalidade – log concentração, o produto a testar deve provocar entre



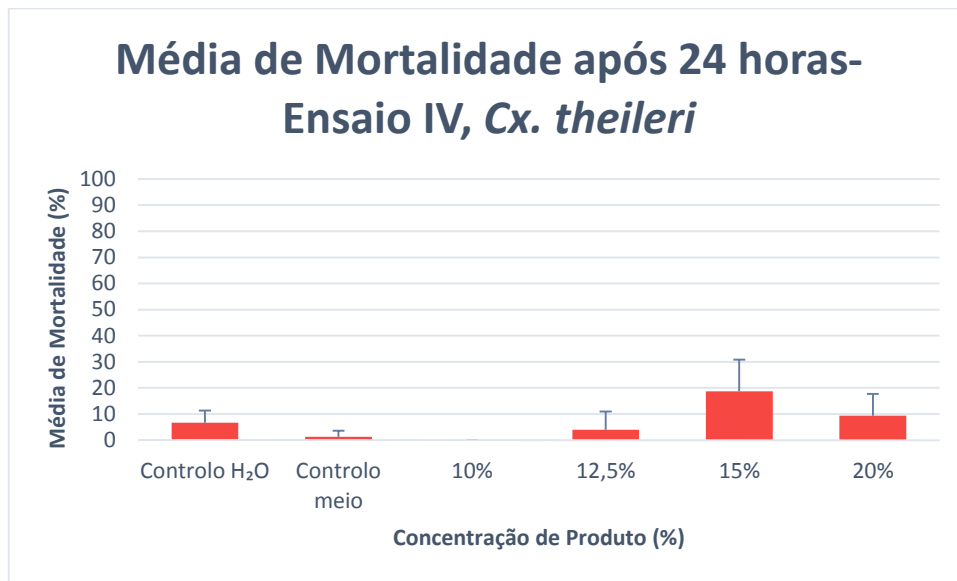
10% a 90% de mortalidade. Idealmente a regressão deve ser feita com duas a três concentrações com mortalidade abaixo de 50%, e duas a três concentrações com mortalidades acima de 50%.

Às 24 horas foi registada a existência de larvas mortas em todas as concentrações. Num total de oito concentrações testadas, em seis destas foi atingido o valor de 100% de mortalidade. Globalmente, as mortalidades registadas foram superiores às dos ensaios anteriores. Os resultados estão apresentados na Figura 9.



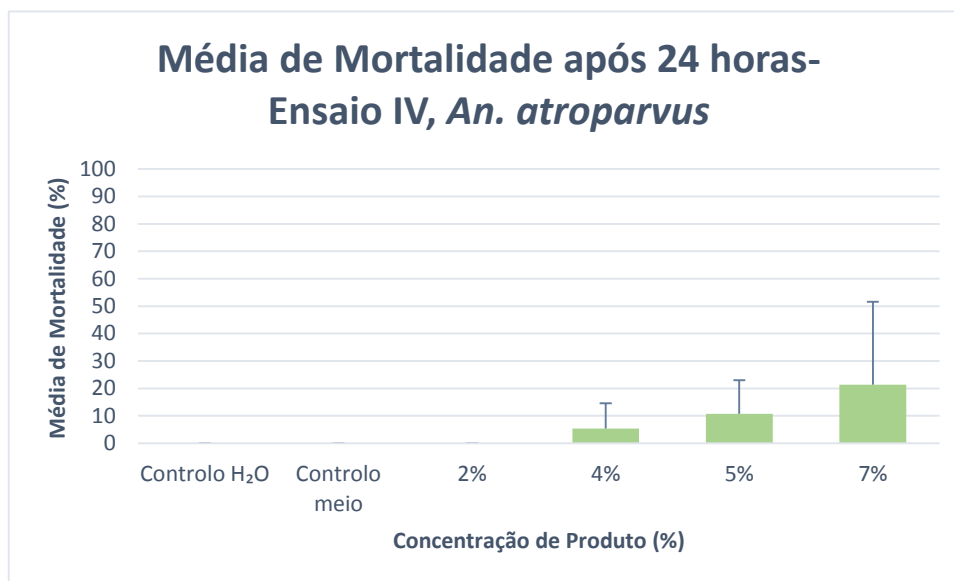
**Figura 9** - Mortalidade após 24 horas no Ensaio III, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão, para 2 réplicas por concentração, de 15 larvas cada.

Os resultados obtidos para *Cx. theileri* no ensaio IV estão apresentados na Figura 10. A mortalidade induzida pelo secretoma apresentou valores muito baixos e irregulares, em que a concentração com maior mortalidade foi de 15%, com média de mortalidade de 18,7%. Já a concentração mais elevada de secretoma, 20%, apresentou média de mortalidade inferior, 9%. Também se observou que a média de mortalidade foi superior no controlo negativo com água desclorada, com média de 6,7%, relativamente ao controlo negativo com meio de cultura estéril em que a média foi de 1,3% de mortalidade.



**Figura 10** - Mortalidade após 24 horas no Ensaio IV, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de *Cx. theileri*, para 3 réplicas por concentração, de 25 larvas cada.

No ensaio com *An. atroparvus*, embora os valores de mortalidade sejam inferiores, registou-se um crescimento gradual com o aumento de concentração de secretoma (Figura 11). No entanto, para a concentração mais elevada deste ensaio, 7%, o desvio padrão registado atingiu um valor de 30,3. Este valor traduz a discrepância de mortalidades registadas nas réplicas de 7%, onde se observaram respectivamente valores de 14, 0 e 2 larvas mortas por réplica.



**Figura 11** - Mortalidade após 24 horas no Ensaio IV, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de *An. atroparvus*, para 3 réplicas por concentração, de 25 larvas cada.

Em estudos anteriores, tal como se procedeu nos ensaios I, II, III e IV, os autores optaram também por aplicar o extrato de bactéria em água para a realização dos ensaios, nos quais a contagem de larvas mortas era igualmente realizada após 24 horas de exposição ao produto (Karthik et al., 2011).

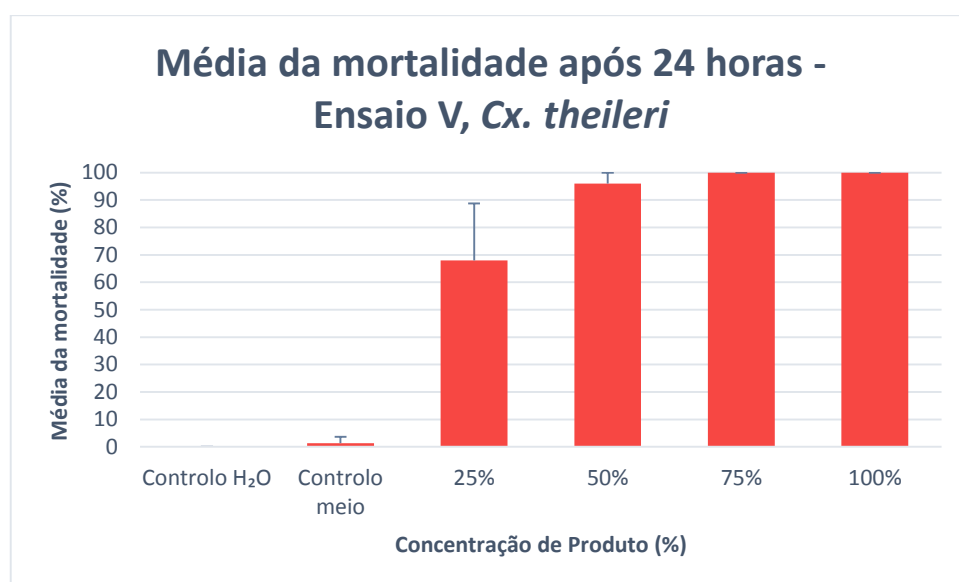
#### IV.1.2. Ensaios com secretoma bacteriano filtrado

Os ensaios V e VI foram realizados em meio de cultura que por sua vez continha o secretoma bacteriano. O motivo desta alteração nos ensaios foi a maior facilidade de obter secretoma em meio de cultura, ao invés do secretoma liofilizado. Para estes ensaios foram também utilizadas larvas L3-L4 de *Cx. theileri* e *An. atroparvus*. Em cada ensaio foram testadas concentrações diferentes, de lotes também diferentes.

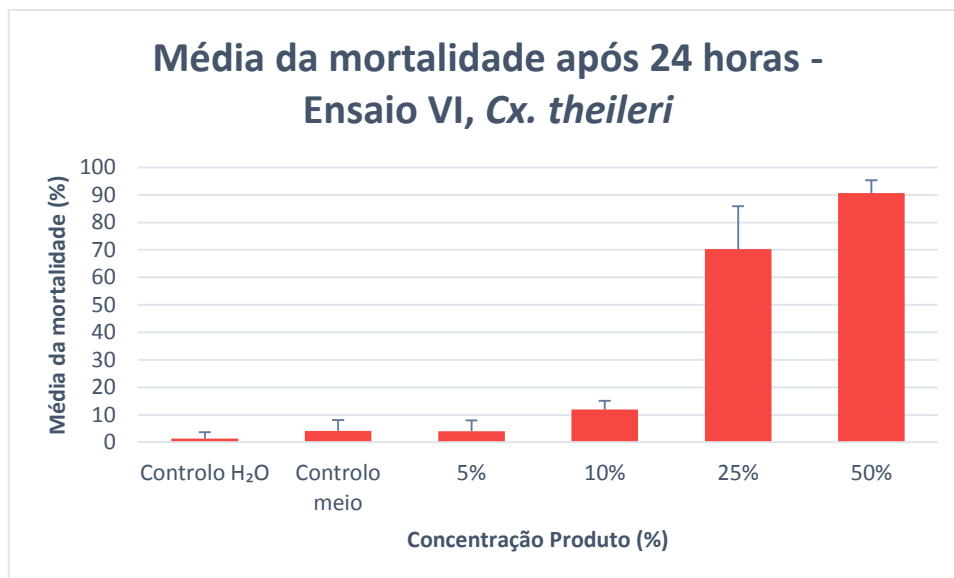
Os resultados do ensaio V para larvas de *Cx. theileri* estão representados na Figura 12. Tanto na concentração de 75% como a de 100% atingiu-se 100% de mortalidade, apresentando a concentração de 50% um valor de 96%. A concentração de 25%

apresentou o valor mais baixo de mortalidade, designadamente 68%. Nesta concentração, verificou-se uma elevada variabilidade entre as réplicas, justificando o mais elevado (20,8) valor de desvio padrão encontrado.

No ensaio VI com *Cx. theileri*, apenas duas concentrações se mantiveram semelhantes às do ensaio V, especificamente as de 25% e 50%. Os valores de mortalidade de ambas as concentrações não sofreram alterações significativas, sendo que neste ensaio, em 25% a mortalidade aumentou de 68% para 70,3% e em 50% diminuiu de 96% para 90,67%. Por sua vez, as novas concentrações testadas, de valores inferiores, resultaram em valores de mortalidade também menores.

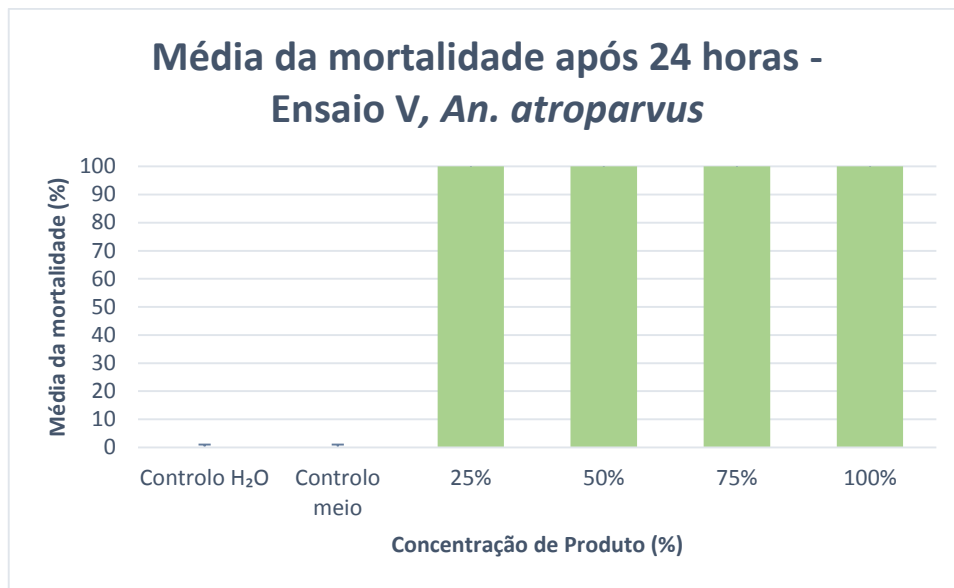


**Figura 12** - Mortalidade após 24 horas no Ensaio V, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de *Cx. theileri*, para 3 réplicas por concentração, de 25 larvas cada.

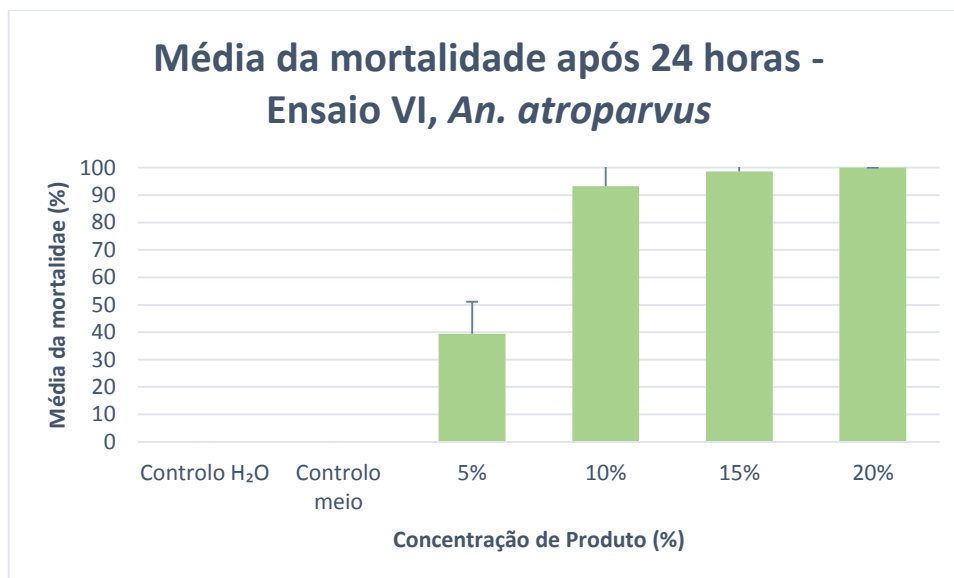


**Figura 13** - Mortalidade após 24 horas no Ensaio VI, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de *Cx. theileri*, para 3 réplicas por concentração, de 25 larvas cada.

Os resultados do ensaio V com larvas de *An. atroparvus* estão apresentados na Figura 14. Foram testadas concentrações superiores às usadas no ensaio IV, uma vez que as mortalidades registadas neste foram de, no máximo, 21,33%. Em todas as concentrações se registou 100% de mortalidade. No ensaio VI com *An. atroparvus* (Figura 15), em que se usaram concentrações intermédias às dos ensaios anteriores com esta espécie, registaram-se novamente valores muito elevados de mortalidade larvar, inclusivamente nas concentrações mais baixas. À exceção da concentração de 5%, que resultou numa média de mortalidade de 39,42%, nas restantes observaram-se valores bastante superiores, entre 93% e 100%. Independentemente da concentração de produto, a espécie *An. atroparvus* exibiu sempre resultados mais elevados de mortalidade que *Cx. theileri*.



**Figura 14** - Mortalidade após 24 horas no Ensaio V, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de *An. atroparvus*, para 3 réplicas por concentração, de 25 larvas cada.



**Figura 15** - Mortalidade após 24 horas no Ensaio VI, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de *An. atroparvus*, para 3 réplicas por concentração, de 25 larvas cada.

Nos ensaios realizados por Elimam et al. (2009), em que foram testados extratos da planta *Calotropis procera*, também se observaram resultados de mortalidade variáveis para as duas espécies testadas, *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles arabiensis*., em que

as larvas de *Cx. quinquefasciatus* se revelaram mais susceptíveis aos extratos de *Calotropis procera* do que as larvas de *An. arabiensis*. Os autores sugerem que as diferenças de suscetibilidade das espécies face ao larvicida possam estar relacionadas com as características fisiológicas das mesmas. Também os autores Singh e Prakash (2012) comprovaram o efeito larvicida de *Streptomyces citreofluorescens* em larvas de *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* através de ensaios em meio bacteriano filtrado. Os ensaios foram realizados com larvas dos quatro estádios larvares, e as Concentrações Letais foram variáveis entre os mesmos e entre as espécies. Tal como se procedeu para os ensaios V e VI, as larvas eram diretamente colocadas no meio e os valores de mortalidade foram lidos após 24 horas.

#### IV.1.3. Ensaios com fração

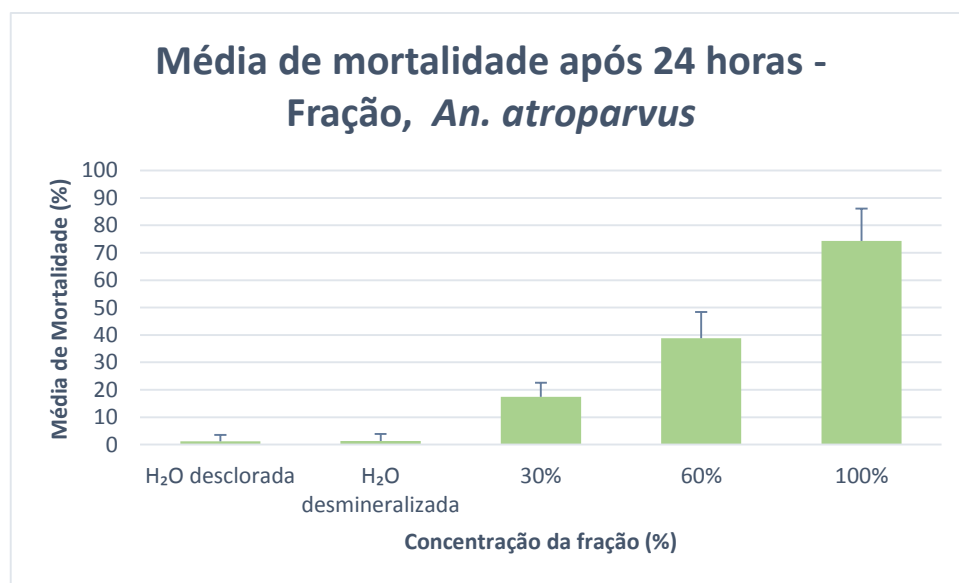
Procedeu-se a um ensaio preliminar com fração de compostos de baixo peso molecular a concentração 100%, com o intuito de testar se esta manteria o efeito larvicida. A quantidade de produto biológico disponibilizada apenas permitia a realização de um ensaio preliminar com apenas uma espécie pelo que se optou por realizá-lo com *Cx. theileri*. Assim, foram feitas três réplicas da concentração 100%, com 15 larvas num volume final de 250 mL cada. Após 24 horas, havia registo de larvas mortas em todas as réplicas. Neste primeiro ensaio com fração, a média de mortalidade ultrapassou os 50% dado que em cada réplica o número de larvas mortas foi mais de metade do total. No controlo não se registou mortalidade em nenhuma réplica (Tabela 1).

**Tabela 1** - Média da mortalidade e desvio padrão obtidos com a fração a concentração 100% em *Cx. theileri*, após 24 horas.

Fração - <i>Cx.</i> <i>theileri</i>	Nº de larvas (0h)	Nº de larvas mortas (24 h)	Mortalidade (%)	Média de Mortalidade	Desvio Padrão
I	15	11	73,33	64,44	10,18
II	15	10	66,67		
III	15	8	53,33		

O segundo lote de fração posteriormente obtido foi utilizado em *An. atroparvus*, e foram testadas três concentrações diferentes: 30%, 60% e 100%. Foram feitos dois controlos negativos, com água desmineralizada e com água desclorada. Este ensaio foi realizado apenas com exemplares de *An. atroparvus*, dada não disponibilidade de mosquitos *Cx. theileri*.

Neste ensaio foi possível observar um aumento progressivo de mortalidade com o aumento de quantidade de produto, embora não se tenha atingido 100% de mortalidade (Figura 16). Foi registada mortalidade no controlo negativo, no entanto em valor reduzido e não implicando a invalidade do ensaio, podendo estar relacionado com a condição das larvas utilizadas ou o seu manuseamento. Em relação aos resultados de concentração 100% em *Cx. theileri*, em que se obteve mortalidade de 64,44%, e tal como nos ensaios anteriores, *An atroparvus* apresentou uma mortalidade superior (74,29%).



**Figura 16-** Mortalidade após 24 horas no ensaio com fração, com representação da mortalidade média e dos desvios padrão de *An. atroparvus*, para 4 réplicas por concentração, de 25 larvas cada.

Nos ensaios com fração de compostos de baixo peso molecular em ambas as espécies, os resultados obtidos apontam para uma maior homogeneidade da resposta obtida com este produto, dada a menor variação de mortalidade entre as réplicas duma



mesma concentração de teste, e consequente redução do respectivo desvio padrão da mortalidade média. No entanto, não tendo sido possível em tempo útil prosseguir com novos ensaios, não foi também possível a quantificação da eventual relação concentração-mortalidade.

Para a determinação da reta de regressão probit mortalidade - log concentração, é necessário que os resultados obtidos ao testar o produto estejam de acordo com os requisitos estabelecidos para os testes de sensibilidade pela OMS (WHO, 2005), nomeadamente identificação de pelo menos quatro concentrações de larvicida com mortalidades associadas entre 10 e 90% e desvio padrão da mortalidade média de cada concentração inferior a 25% da mesma. Na eventualidade de ser possível determinar a reta de regressão probit mortalidade - log concentração para as concentrações testadas, foram examinados os resultados dos ensaios I, II e V, nos quais foram testadas as mesmas concentrações, especificamente, 25%, 50%, 75% e 100%. Procedeu-se ao cálculo da média de cada concentração, com base nas suas réplicas. Uma vez obtidas as médias, foi necessário confirmar se o desvio padrão das réplicas não era superior a 25% da média de mortalidade. Para determinar a reta de regressão probit mortalidade - log concentração, são consideradas para esta análise concentrações que atinjam níveis de mortalidade entre 10% e 90%, das quais duas a três das concentrações devem apresentar mortalidade inferior a 50% e duas ou três concentrações em que a mortalidade seja superior a 50%. No entanto, os resultados obtidos não corresponderam a estes requisitos. Os valores de desvio padrão foram sempre superiores a 25% da média de mortalidade, confirmando que não houve reprodutibilidade entre os ensaios onde foram testadas as mesmas concentrações, assim como também foi registado dentro do mesmo lote, uma grande variabilidade para a mesma concentração. De igual forma, em nenhum ensaio foram encontradas mortalidades entre 10% e 90%, em que duas fossem inferiores a 50% e as restantes duas superiores a 50% (Anexo I). Como tal, os resultados individuais dos ensaios não cumpriam os requisitos definidos pela OMS para se considerarem válidos para a determinação da reta de regressão probit mortalidade - log concentração dos mesmos, que posteriormente permitiria avançar para o cálculo das Concentrações Letais 50%, 90% e 99% do produto. Assim, apenas pôde confirmar-se a existência de ação larvicida do secretoma testado, sendo evidenciada uma correlação positiva entre a concentração e a mortalidade. A elevada variabilidade de resultados entre ensaios

conduzem a admitir que a composição dos diferentes lotes de secretoma testados não seria idêntica. Esta dificuldade poderá ser futuramente ultrapassada com ensaios conduzidos com frações do secretoma total, com as quais será mais exequível testar as mesmas concentrações de composto(s) ativo(s).

Globalmente, os mosquitos representam uma ameaça considerável para humanos, e outros vertebrados, apresentando as doenças cujos agentes patogénicos transmitem elevados índices de morbilidade e mortalidade. Por ano, mais de 700 milhões de pessoas são afetadas com doenças transmitidas por mosquitos (Taubes, 2000), o que realçou a importância do controlo de mosquitos a nível de saúde pública, por todo o mundo (El-Sheikh et al., 2012). Os inseticidas sintéticos, quando aplicados indiscriminadamente, podem ser prejudiciais à saúde e ao ambiente, afetar outros organismos e contribuir para o desenvolvimento de resistências aos inseticidas por parte dos mosquitos (Nauen, 2007; Elimam et al., 2009). Todos estes factores contribuíram para a necessidade da criação de novas alternativas para controlo de mosquitos, com produtos não prejudiciais ao ambiente, de utilização biodegradável e com propriedades inseticidas que atinjam apenas as espécies alvo (Isman, 2006; Pavela, 2008; Jawale et al., 2010).

Neste contexto, vários estudos têm sido realizados com o intuito de encontrar novos produtos com capacidade inseticida e seguros para o ambiente (Edriss et al., 2013). Diversos autores promoveram a utilização de extratos provenientes de plantas como inseticidas naturais. Os autores Elimam et al. (2009) confirmaram a capacidade inseticida de produtos obtidos a partir de folhas de *Calotropis procera* em larvas de *Anopheles arabiensis* e de *Culex quinquefasciatus*, principais vetores de malária e filaríases, respetivamente. Extratos da planta *Cestrum nocturnum* foram testados como larvicida em larvas de *Aedes aegypti* com resultados eficazes, no estudo de Jawale et al. (2010). Organismos como a esponja marinha *Cliona celata* também provaram ter atividade ovicida, larvicida e repelente contra o vetor de malária *Anopheles stephensi* (Reegan et al., 2015).

Múltiplos estudos confirmaram o potencial inseticida de diferentes bactérias, além de Bti e Bs. Os autores Karthik et al. (2011) verificaram que extratos provenientes das actinobactérias marinhas *Saccharomonospora spp.*, *Streptomyces roseiscleroticus* e *Streptomyces gedanensis* possuíam atividade ovicida, larvicida e repelente nas espécies

*Culex tritaeniorhynchus* e *Culex gelidus*, apresentando diferentes desempenhos conforme o tipo de atividade. A bactéria *Streptomyces citreofluorescens* provou ser eficaz como larvicida para as espécies *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (Singh e Prakash, 2012). Produzido pelas neurotoxinas espinosina A e D da bactéria *Saccharopolyspora spinosa*, Spinosad foi testado como larvicida, em condições laboratoriais assim como em campo, para *Anopheles stephensi*. No estudo de Prabhu et al. (2011) mostrou-se eficaz ao induzir mortalidade em laboratório e em campo. No estudo realizado por Prabakaran et al. (2003) foi confirmado o potencial larvicida e pupicida da bactéria *Pseudomonas fluorescens*, face a três espécies de mosquitos vetores, *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. Foi preparada uma solução contendo metabolitos da bactéria e testada em larvas L4 e em pupas das três espécies, verificando-se que a mortalidade das pupas requeria menor dosagem, e que entre as três espécies, as larvas e pupas de *Anopheles stephensi*, foram as mais sensíveis à solução. Os autores Nabar e Lokegaonkar (2015) confirmaram o potencial larvicida de bactérias dos géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Corynebacterium* em larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, em que os metabolitos secundários de *Bacillus* e *Pseudomonas* causaram 100% de mortalidade nas larvas. As propriedades inseticidas das proteínas de *Pseudomonas fluorescens* foram também analisadas por Paily (2014) e Sadanandane et al. (2003) em larvas e pupas de *Culex quinquefasciatus*.

No presente estudo, os ensaios decorridos foram realizados de acordo com o protocolo definido pela OMS (WHO, 2005) e comprovou-se o potencial inseticida do secretoma de uma bactéria da família *Pseudomonadaceae*, para as espécies *Culex theileri* e *Anopheles atroparvus*. A variância de mortalidades observadas entre as mesmas concentrações poderá ser justificada por múltiplos fatores. A condição das larvas utilizadas poderia influenciar os resultados, designadamente, caso as larvas testadas numa concentração específica se encontrassem mais débeis. A preparação do produto também poderá ser considerada uma das principais causas para a diferença de mortalidades encontradas. Se o produto não estiver devidamente ressuspensionado nas ampolas, poderá afetar a ação do mesmo, que por sua vez se irá refletir nas mortalidades obtidas para a concentração em questão. O facto de os lotes poderem apresentar diferentes composições, justificará também alguns dos resultados obtidos. As composições podem diferir entre si na concentração dos componentes do produto com efeito biocida. No caso de estar em

maior quantidade num lote, justificaria os níveis elevados de mortalidade para o ensaio respetivo. Futuramente, deveria prosseguir-se com análise qualitativa e quantitativa da composição deste secretoma e ensaios de sensibilidade larvar a frações de composição fixa do mesmo.

### IV.2. Alterações morfológicas observadas em larvas sob efeito do produto

Posteriormente ao estudo do efeito larvicida do secretoma, procedeu-se à observação por microscopia ótica de larvas vivas e mortas, de controlo negativo e das concentrações do produto testado nos vários ensaios. A análise em microscopia ótica permitiu observar possíveis alterações induzidas pelo larvicida. Teve-se em atenção possíveis modificações a nível da tonalidade, cabeça, tórax, traqueias, tubo digestivo, abdómen, sifão (em larvas de *Cx. theileri*) e papilas anais.

Idealmente, as larvas seriam analisadas por ensaio para observar os efeitos de cada lote. No entanto, nem todos os ensaios exibiam alterações detetáveis ao microscópio ótico. Como tal, foram selecionados o ensaio II e o ensaio V, onde se observaram alterações mais evidentes nas larvas de *Cx. theileri*, nas concentrações de 25%, 50%, 75% e 100%. No ensaio II foi registado um aumento gradual de mortalidade face ao aumento das concentrações e no ensaio V houve um registo de elevada mortalidade para as quatro concentrações.

Para o ensaio II, foram selecionadas três características que apresentaram variações entre as larvas do controlo negativo e as larvas sujeitas ao produto: tonalidade geral, tonalidade do sifão e partículas presentes no tórax. Foi registada diferença de tonalidade das larvas, a nível do abdómen e do tórax. Larvas expostas à mesma concentração apresentavam tonalidades diferentes, alternando entre tonalidade geral clara ou o tórax mais escurecido que o abdómen. Na Tabela 2 estão registadas as percentagens de larvas de cada tonalidade, por concentração. Através da análise da tabela, observa-se um crescimento do número de larvas que apresentavam tonalidade clara com o aumento de concentração de secretoma. Em contraste, as larvas com o tórax mais escuro, desaparecem a partir da concentração de 50%, que por sua vez, registou apenas 30% desta tonalidade. Esta diminuição de larvas com tórax escurecido e aumento de larvas claras

poderá dever-se à ação do produto a nível do tórax, que poderia justificar a diferença de tonalidade entre as mesmas.

**Tabela 2** - Tonalidade das larvas do Ensaio II (10 larvas por concentração).

Concentração	Tonalidade	
	Clara (Abdómen e tórax da mesma cor)	Tórax mais escuro que o abdómen
Controlo	60%	40%
25%	50%	50%
50%	70%	30%
75%	100%	0
100%	100%	0

Em relação ao tórax, foram ainda detetadas partículas acastanhadas nesta área mas estas foram observadas tanto no controlo como nas larvas em contato com o secretoma, e a forma aleatória e desorganizada em que se encontravam anula a hipótese de integrarem a anatomia da larva. Na Tabela 3 é possível observar que a percentagem de larvas com partículas tende a diminuir com o aumento da concentração. Uma vez que as larvas de controlo negativo também apresentam estas partículas, elas deverão estar já presentes no início do ensaio podendo pôr-se a hipótese de que o seu desaparecimento progressivo possa estar relacionado com a atividade larvicida do secretoma, mais rápida e evidente em concentrações mais elevadas deste.

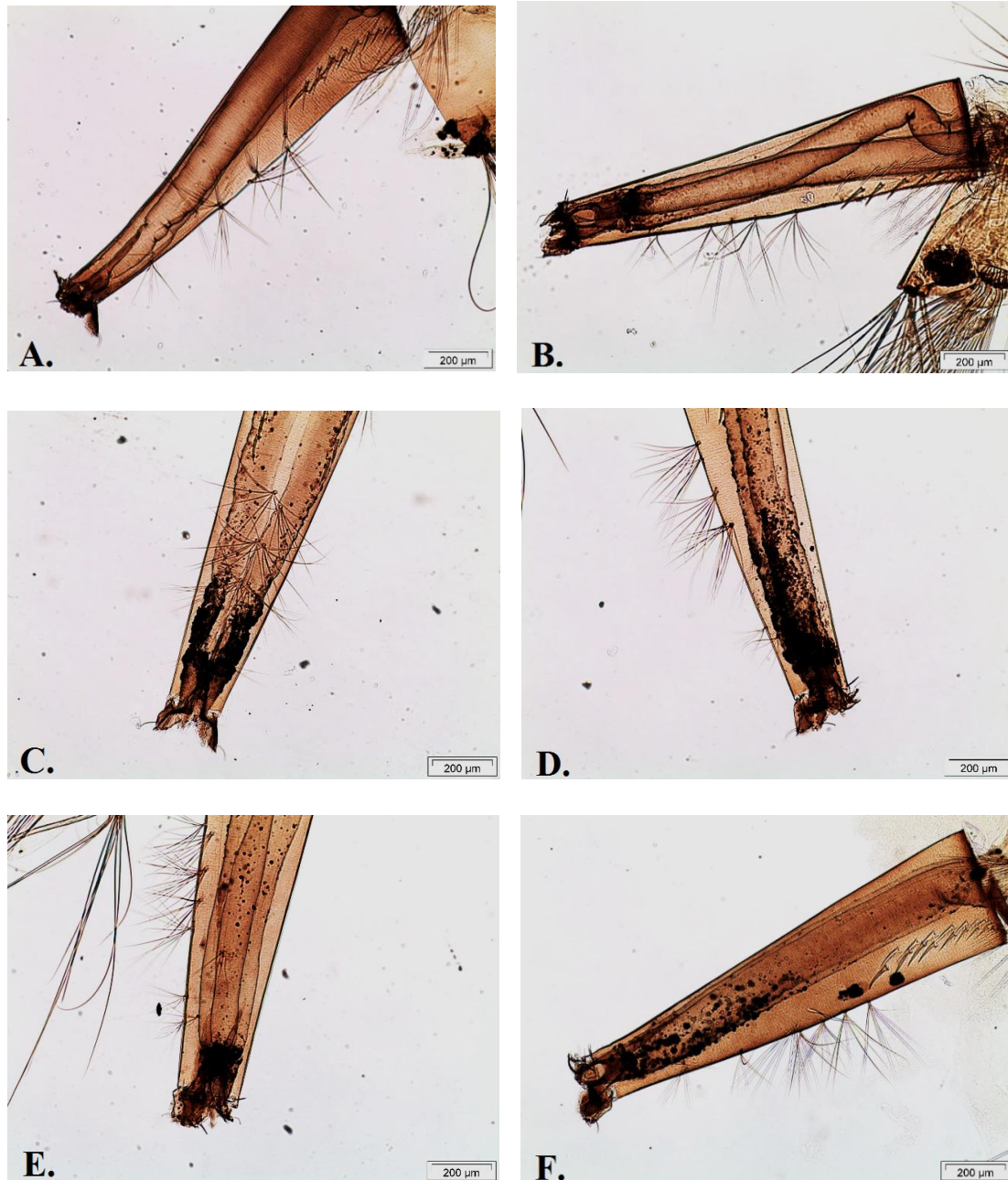
**Tabela 3**- Presença de partículas no tórax, Ensaio II.

Concentração	Nº de larvas com presença de partículas no tórax		
	Baixa	Média	Alta
Controlo	40%	10%	10%
25%	20%	30%	-
50%	50%	10%	-
75%	10%	-	-
100%	-	-	-

As alterações observadas a nível do sifão nas diferentes concentrações estão representadas na Figura 17. É de salientar o que parece ser uma deposição de partículas a revestir a face externa das traqueias, detetável em larvas de todas as concentrações, à exceção do controlo negativo.

Todas as larvas do controlo observadas possuíam um sifão e traqueias sem alterações visíveis (Figura 17-A). Na concentração de 25%, metade dos exemplares mortos às 24 h e observados apresentava já alguma deposição à volta da extremidade das traqueias (Figura 17-B). Nas larvas da concentração 50%, praticamente todas as larvas já exibiam partículas depositadas à volta das traqueias, sendo a quantidade e área de distribuição de partículas variável entre os exemplares (Figura 17-C). Estas foram igualmente observadas ao longo das traqueias nas larvas de 75%. Aqui, 80% das larvas apresentavam traqueias com partículas, contrariamente às restantes 20% em que o sifão era de aspeto normal. Na concentração de 100%, foram registadas 80% de larvas com deposição de partículas (Figura 17-E e F). Apenas 20% larvas apresentavam o sifão sem alterações. A deposição de partículas registada em 100% apresentava-se menos acentuada que nas concentrações anteriores. O facto de na máxima concentração de secretoma, 100%, as larvas apresentarem menor deposição de partículas nas traqueias que as larvas mortas de concentrações inferiores pode dever-se ao tempo de atuação do produto antes de ocorrer a morte das mesmas. Recordando os resultados deste ensaio, a concentração de 100% obteve 100% de mortalidade após 24 horas, período ao fim do qual o protocolo da OMS determina que devem ser registados os resultados. No entanto, nas tinas de ensaio com esta concentração, o aparecimento de larvas mortas foi mais rápido e os 100% de mortalidade foram sempre atingidos antes do final das 24h. Do mesmo modo, a quantidade de partículas à volta das traqueias é menor nas larvas de 75%, que por sua vez registou maior mortalidade às 24 horas, do que em 50%. Desta forma, parecem co-existir dois efeitos do secretoma distintos: a deposição de partículas, que não estará diretamente associada à mortalidade larvar, e a própria mortalidade, que deverá dever-se a outro mecanismo induzido pelo secretoma bacteriano. Esta hipótese justificaria igualmente os resultados da dose de 25%, onde praticamente não foram detetadas partículas ao longo das traqueias mas apenas na extremidade do sifão. Dado que a dose é menor, necessitaria de mais tempo de atuação para que as partículas alcançassem as traqueias. Estes resultados sugerem também a necessidade de prossecução do estudo da atividade deste

secretoma bacteriano, averiguar-se a origem e mecanismo de deposição das partículas detetadas, sua relação com a morbilidade ou mortalidade larvar, e identificação da causa da mortalidade.



**Figura 17-** Aspeto de sifão de larvas mortas de *Cx. theileri* de Ensaio II, ampliação 400x. A- controlo negativo, B-concentração de 25%, C- concentração de 50%, D- concentração de 75%, E e F- concentração de 100%. Fotografias da autora.

O ensaio V permitiu detetar efeitos morfológicamente visíveis do secretoma em larvas de *Cx. theileri*, mas não em larvas de *An. atroparvus* onde não se observaram alterações morfológicas. Este ensaio foi realizado com secretoma em meio de cultura após remoção das bactérias por filtração, tendo sido utilizado meio estéril como segundo controlo negativo. Nas larvas de *Cx. theileri* foram observadas alterações ao nível da cor da larva e da presença de partículas nas papilas anais.

À exceção das larvas de controlo negativo em água desclorada, que na sua maioria apresentavam tórax mais escuro que o abdómen, em todas as restantes concentrações as larvas exibiam tonalidade homogénea, sem variação de cor entre tórax e abdómen. Esta semelhança de cor do tórax e abdómen das larvas verificou-se igualmente em larvas do controlo negativo com meio, pelo que esta alteração deverá relacionar-se com algum efeito do próprio meio de cultura e não estar diretamente relacionado com a atuação do secretoma. Foi ainda observada nas larvas deste ensaio alteração morfológica ao nível das papilas anais, nas quais se detetou a presença de partículas acastanhadas cuja quantidade tendia a aumentar com a concentração, desde o controlo com água desclorada até à concentração de 100%. Na Tabela 4, é possível constatar o aumento do número de larvas com partículas e da quantidade de partículas, embora não muito acentuados, com o aumento da concentração de secretoma. Embora em nenhuma delas tenha sido registado quantidade elevada de partículas, apenas na concentração máxima de 100% se observou um exemplar com quantidade superior de partículas comparativamente às restantes concentrações. Dado que as papilas anais controlam a osmorregulação, este aumento de partículas poderá ter interferido com esta função vital, o que, consequentemente, poderia eventualmente levar à morte da larva.

Embora a existência de estudos sobre esta matéria seja escassa, Rocha et al. (2015) observaram também alterações morfológicas nas papilas anais de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a produtos derivados da planta *Foeniculum vulgare*.



**Tabela 4** - Número de larvas com partículas presentes nas papilas anais e respectiva quantidade, Ensaio V.

Concentração	Quantidade de partículas nas papilas anais		
	Baixa	Média	Alta
Controlo H <sub>2</sub> O	10%	-	-
Controlo meio	20%	-	-
25%	10%	-	-
50%	20%	-	-
75%	20%	-	-
100%	50%	10%	-

Inicialmente, um dos objetivos do trabalho a desenvolver consistia no acompanhamento dos espécimes sobreviventes à exposição ao secretoma até ao final da fase adulta, com o intuito de detetar possíveis efeitos negativos na *fitness* dos mesmos, observável em um ou mais parâmetros, nomeadamente fecundidade, longevidade de machos e fêmeas, número de posturas e de refeições sanguíneas das fêmeas. No entanto, a variação inter e intra ensaios observada implicou a continuada busca de procedimento de ensaio que permitisse reduzi-la a níveis aceitáveis. Assim, não foi possível proceder à quantificação segura da relação concentração-mortalidade, que permitiria determinar a Concentração Letal 50% a usar nos referidos estudos de *fitness*.

## **V. Conclusão**

## V. Conclusão

Este estudo permitiu concluir que o produto testado tem de facto potencial biocida, comprovado em ensaios com *Cx. theileri* e *An. atroparvus*. Embora haja registo de mortalidade em todos os lotes testados, nem sempre os resultados foram os esperados. A falta de concordância entre resultados das mesmas concentrações em diferentes ensaios não permitiu a determinação da reta de regressão probit mortalidade - log concentração, que por sua vez levaria ao cálculo da Concentração Letal a 50%, 90% e 99%.

Face à variância obtida nos resultados, futuramente os compostos constituintes do secretoma deverão ser testados separadamente para compreender qual, ou quais, apresentam capacidade biocida. Assim, deveriam ser realizados novos ensaios, recorrendo a novas concentrações, que permitissem com os resultados obtidos, a determinação da reta de regressão probit mortalidade - log concentração.

Verificou-se uma ação diferente nas duas espécies de mosquito usadas. A mortalidade observada foi superior em *An. atroparvus* mas, no entanto, os efeitos associados à atividade larvicida do secretoma e morfologicamente observáveis foram mais acentuados em larvas de *Culex theileri* do que em larvas de *Anopheles atroparvus*. Nas larvas de *An. atroparvus* observadas não foram registadas alterações morfológicas entre larvas de controlo negativo e larvas expostas ao produto. A alteração morfológica mais evidente surgiu ao nível do sifão das larvas *Culex theileri*, onde no exterior das traqueias foi possível observar deposição de partículas, em todas as concentrações, excetuando o controlo negativo. Também foram registadas alterações ao nível de tonalidade e presença de partículas no tórax. Porém, estas modificações não se podem considerar consistentes, já que não foram observadas em todos os ensaios. É importante uma abordagem mais aprofundada, possivelmente recorrendo a técnicas histoquímicas, de modo a expandir o conhecimento sobre o modo de atuação e efeitos causados pela exposição ao secretoma testado.

Seria importante, para completa avaliação da atividade deste secretoma, proceder ao acompanhamento do crescimento de imaturos sobreviventes a concentrações subletais dos ensaios até ao final da fase adulta, para permitir a avaliação da *fitness* dos mosquitos,

através da quantificação de parâmetros como a longevidade, número de posturas por fêmea, número de ovos por postura e frequência diária de picada.

Este estudo contribuiu para uma primeira avaliação deste secretoma, que demonstra sem dúvida um potencial de aplicabilidade em controlo larvar de espécies de mosquitos, e que deveria ser explorado com maior detalhe, em particular no que concerne ao seu possível uso como alternativa a produtos químicos inseticidas.

## **VI. Referências Bibliográficas**

## VI. Referências Bibliográficas

- Abdalla, H., Wilding, C. S., Nardini, L., Pignatelli, P., Koekemoer, L. L., Ranson, H. e Coetzee, M. (2014) Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* in Sudan: temporal trends and underlying mechanisms. *Parasites & vectors*. 7 (1). p.213.
- Alphey, L. e Andreassen, M. (2002) Dominant lethality and insect population control. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 121. p.173–178.
- Alvarez, L. C., Ponce, G., Oviedo, M., Lopez, B. e Flores, A. E. (2014) Susceptibility status of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos in Venezuela. *Pest Management Science*. 70. p.1262–1266.
- Anogwih, J. A., Makanjuola, W. A. e Chukwu, L. O. (2015) Potential for integrated control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) using larvicides and guppies. *Biological Control*. 81. p.31–36.
- Bansal, S. K., Singh, K. V., Sharma, S. e Sherwani, M. R. K. (2011) Comparative larvicidal potential of different plant parts of *Withania somnifera* against vector mosquitoes in the semi-arid region of Rajasthan. *Journal of Environmental Biology*. 32 (1). p.71–75.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C. e Kaiser, A. (2010) Biology of Mosquitoes. In: *Mosquitoes and Their Control*. Berlin: Springer-Verlag.
- Bilal, H., Akram, W. e Ali-hassan, S. (2012) Larvicidal Activity of Citrus Limonoids against *Aedes albopictus* Larvae. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*. 6 (2). p.104–111.
- Blayneh, K. W. e Mohammed-Awel, J. (2014) Insecticide-resistant mosquitoes and malaria control. *Mathematical Biosciences*. 252 (1). p.14–26.

- Bourtzis, K., Dobson, S. L., Xi, Z., Rasgon, J. L., Calvitti, M., Moreira, L. A., Bossin, H. C., Moretti, R., Baton L. A., Hughes G. L., Mavingui, P. e Gilles, J. R. L. (2014) Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta Tropica*. 132. p.S150–S163.
- Bravo, A., Gill, S.S. e Soberón, M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 49 (4). p.423–435.
- Burt, A. (2014) Heritable strategies for controlling insect vectors of disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 369: 20130432. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0432>. [Acedido em março de 2015].
- Carlson, D. B. e Vigliano, R. R. (1985) The effects of two different water management regimes on flooding and mosquito production in a salt marsh impoundment. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1 (2). p.203–11.
- Cetin, H., Erler, F. e Yanikoglu, A. (2004) Larvicidal activity of a botanical natural product, AkseBio2, against *Culex pipiens*. *Fitoterapia*. 75. p.724–728.
- Coleman, M. e Hemingway, J. (2007) Insecticide resistance monitoring and evaluation in disease transmitting mosquitoes. *Journal of Pesticide Science*. 32 (2). p.69–76.
- Dambach, P., Louis, V. R., Kaiser, A., Ouedraogo, S., Sié, A., Sauerborn, R. e Becker, N. (2014) Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against malaria mosquitoes in northwestern Burkina Faso. *Parasites & vectors*. 7. p. 371-379.
- Djènontin, A., Pennetier, C., Zogo, B., Soukou, K. B., Ole-Sangba, M., Akogbéto, M., Chandre, F., Yadav, R. e Corbel, V. (2014) Field efficacy of Vectobac GR as a mosquito larvicide for the control of anopheline and culicine mosquitoes in natural habitats in Benin, West Africa. *PLoS ONE*. 9 (2): e87934. doi:10.1371/journal.pone.0087934. [Acedido em junho de 2015]

- Doucoure, S., Mouchet, F., Cornelié, S., Drame, P. M., D'Ortenzio, E., DeHecq, J. S. e Remoue, F. (2014) Human antibody response to *Aedes albopictus* salivary proteins: a potential biomarker to evaluate the efficacy of vector control in an area of Chikungunya and Dengue Virus transmission. *BioMed Research International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/746509>. [Acedido em agosto de 2015]
- Edriss, A. E., Satti, A. A. e Alabjar, Z. A. (2013) Larvicidal properties of two asclepiadaceous plant species against the mosquito *Anopheles arabiensis* Patton (Diptera: Culicidae). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 12. p.59–66.
- Eldridge, B. F. (2005). Mosquitoes, the Culicidae. In: Marquardt, W. C. (ed.). *Biology of Disease Vectors*. Burlington: Elsevier Academic Press.
- Elimam, A. M., Elmalik, K. H. e Ali, F. S. (2009) Efficacy of leaves extract of *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) in controlling *Anopheles arabiensis* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 16 (2). p.95–100.
- El-Sheikh, T. M. Y., Al-Fifi, Z. I. A. e Alabboud, M. A. (2012) Larvicidal and repellent effect of some *Tribulus terrestris* L., (Zygophyllaceae) extracts against the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Saudi Chemical Society*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2012.05.009>. [Acedido em abril de 2015].
- Fillinger, U., Knols, B. G. J. e Becker, N. (2003) Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Tropical Medicine and International Health*. 8 (1). p.37–47.
- Gullan P. J. e Cranston P. S. (2005) *The Insects, An Outline of Entomology*. 3rd Ed. Malden: Blackwell Publishing Ltd.
- Isman, M. B. (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*. 51 (1). p.45–66.



- Jawale, C., Kirdak, R. e Dama, L. (2010) Larvicidal activity of *Cestrum nocturnum* on *Aedes aegypti*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 5 (1). p.39–40.
- Joseph, C. C., Ndoile, M. M., Malima, R. C. e Nkunya, M. H. (2004) Larvicidal and mosquitocidal extracts, a coumarin, isoflavonoids and pterocarpan from *Neorautanenia mitis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 98 (8). p.451–455.
- Karthik, L., Gaurav, K., Rao, K. V., Rajakumar, G. e Rahuman, A. A. (2011) Larvicidal, repellent, and ovicidal activity of marine actinobacteria extracts against *Culex tritaeniorhynchus* and *Culex gelidus*. *Parasitology Research*. 108 (6). p.1447–1455.
- Karunaratne, S. H. P. P., Weeraratne, T. C., Perera, M. D. B. e Surendran, S. N. (2013) Insecticide resistance and efficacy of space spraying and larviciding in the control of dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Sri Lanka. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 107 (1). p.98–105.
- Kawada, H., Dohara, K. e Shinjo, G. (1988) Laboratory and field evaluation of an insect growth regulator, a-phe- noxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) propyl ether, as a mosquito larvicide. *The Japan Society of Medical Entomology and Zoology*. 39 (4). p.339–346.
- Kumar, S., Mishra, M., Wahab, N. e Warikoo, R. (2014) Larvicidal, repellent, and irritant potential of the seed-derived essential oil of *Apium graveolens* Against Dengue Vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Frontiers in public health*. 2 (147). p.1–6.
- Lacey, L. (2007) *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 23 (2). p.133–63.
- Lima, E. P., Filho, A. M. O., Lima, J. W. O., Júnior, A. N. R., Cavalcanti, L. P. G. e Pontes, R. J. S. (2006) *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39 (3). p.259–263.

## VI. Referências Bibliográficas

- Lima, E. P., Paiva, M. H. S., de Araújo, A. P., da Silva, E. V. G., da Silva, U. M., de Oliveira, L. N., Santana, A. E. G., Barbosa, C. N., de Paiva Neto, C. C., Goulart, M. O. F., Wilding, C. S., Ayres, C. F. J. e de Melo Santos, M. A. V. (2011) Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & vectors*. 4 (1). p.5-17.
- Manson-Bahr, P. E. C. e Bell, D. R. (1987). *Manson's Tropical Diseases* (19th ed.). London: Bailliere Tindall.
- Mdoe, F. P., Cheng, S., Lyaruu, L., Nkwengulila, G., Chang, S. e Kweka, E. J. (2014) Larvicidal efficacy of *Cryptomeria japonica* leaf essential oils against *Anopheles gambiae*. *Parasites & Vectors*. 7.
- <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/426> . [Acedido em agosto de 2015].
- Mosquito Taxonomic Inventory (2008) *Culicidae*. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045>. [Acedido em julho 2015].
- Nabar, B.M. e Lokegaonkar, S. (2015). Larvicidal activity of microbial metabolites extracted from extremophiles against vector mosquitoes. *International Journal of Mosquito Research*. 2 (3). p. 161–165.
- Nauen, R. (2007) Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest management science*. 63. p.628–633.
- Nielsen-Ieroux, C., Rao, D. R., Murphy, R., Carron, A., Mani, T. R. e Mulla, M.S. (2001) Various levels of cross-resistance to *Bacillus sphaericus* strains in *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae ) colonies resistant to *B. sphaericus* strain 2362. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (11). p. 5049–5054. doi:10.1128/AEM.67.11.5049-5054.2001 [Acedido em novembro de 2015].
- Paeporn, P., Supaphathom, K., Sathantriphop, S., Chareonviriyaphap, T. e Yaicharoen R. (2007) Behavioural responses of deltamethrin and permethrin-resistant strains of *Aedes aegypti* when exposed to permethrin in an excito-repellency test system. *Dengue Bulletin*. 31. p.153–159.

- Paily, K. (2014) Gelatinase activity of metabolites of *Pseudomonas fluorescens* Migula on larvae and pupae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *International Journal of Pharma and Biosciences*. 5 (3). p. 234–245.
- Pavela, R. (2008) Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*. 102 (3). p.555–559.
- Perry, T., Batterham, P. e Daborn, P. J. (2011) The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41 (7). p.411–422.
- Prabakaran, G., Paily, K.P., Padmanabhan, V., Hoti, S.L. e Balaraman, K. (2003). Isolation of a *Pseudomonas fluorescens* metabolite/exotoxin active against both larvae and pupae of vector mosquitoes. *Pest Management Science*. 59 (August). p. 21–24.
- Prabhu, K., Murugan, K., Nareshkumar, A. e Bragadeeswaran S. (2011) Larvicidal and pupicidal activity of spinosad against the malarial vector *Anopheles stephensi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 4 (8). p.610–613. [doi:10.1016/S1995-7645\(11\)60157-0](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60157-0). [Acedido em maio de 2015].
- Rajesh, K., Dhanasekaran, D. e Tyagi, B.K. (2015) Mosquito survey and larvicidal activity of actinobacterial isolates against *Culex* larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 14 (2). p.116–122.
- Reegan, A. D., Kinsalin, A. V., Paulraj, M. G. e Ignacimuthu, S. (2015) Larvicidal, ovicidal and repellent activities of marine sponge *Cliona celata* (Grant) extracts against *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 8 (1). p.29–34.
- Regis, L., Silva-Filha, M. H., Nielsen-LeRoux, C. e Charles, J.F. (2001) Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends in Parasitology*. 17 (8). p.377–380.
- Ribeiro, H. (1962) A solidifiable formic acid-PVA solution for transporting, preserving and mounting mosquito larvae and pupae. *Annales de Parasitologie*. 4. p.677–681.

- Rocha, D. K., Matos, O., Novo, M. T., Figueiredo, A. C., Delgado, M. e Moiteiro, C. (2015) Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of *Foeniculum vulgare* essential oils from Portugal and Cape Verde. *Natural Product Communications*. 10 (4). p.677–682.
- Rodhain, F., e Perez, C. (1985) *Précis d'Entomologie Médicale et Vétérinaire. Notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs*. Paris: Maloine.
- Romoser, W. S. (2004) Introduction to Arthropods: Structure, Function and Development. In Eldridge, B. F. and Edman, J. D. (Eds). *Medical Entomology*. Dordrecht: Springer Science + Business Media.
- Sadanandane, C., Reddy, C. M. R., Prabakaran, G. e Balaraman, K. (2003) Field evaluation of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* against *Culex quinquefasciatus* larvae and pupae. *Acta Tropica*. 87 (3). p. 341–343.
- Scholte, E.-J., Ng'habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdulla, S., Killeen, G. F. e Knols B. G. J. (2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*. 308. p. 1641-1642.
- Service, M. W. (1993). Mosquitoes (Culicidae). In Lane, R. P. and Crosskey, R. W. (Eds.). *Medical Insects and Arachnids*. New York: Chapman & Hall.
- Service, M. W. (2012). Introduction to mosquitoes (Culicidae). In: Service, M. W. (Ed.). *Medical entomology for students*. New York: Cambridge University Press.
- Singh, G. e Prakash, S. (2012) Lethal effect of *Streptomyces citreofluorescens* against larvae of malaria, filaria and dengue vectors. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 5 (8). p.594–597.
- Taubes, G. (2000) Vaccines. Searching for a parasites weak spot. *Science*. 290 (5491). p. 434–437.

- Trudel, R. E. e Bomblies, A. (2011) Larvicidal effects of Chinaberry (*Melia azederach*) powder on *Anopheles arabiensis* in Ethiopia. *Parasites & vectors*. 4 (1).
- Walshe, D. P., Garner, P., Adeel, A. A. A., Pyke, G. H. e Burkot, T. (2013) Larvivorous fish for preventing malaria transmission. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 12. CD008090. doi: 10.1002/14651858.CD008090.pub2. [Acedido em maio de 2015]
- WHO (1982) *Manual on environmental management for mosquito control*. Genève: WHO (WHO Offset Publication 66).
- WHO (1983) *Integrated Vector Control*. Genève: WHO (Technical Report Series 688).
- WHO (1997) *Vector control: methods for use by individuals and communities*. Genève: WHO.
- WHO (1999) Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use. Genève: WHO (WHO/CDS/CPC/WHOPES/99.2).
- WHO (2004) *Global Strategic Framework for Integrated Vector Management*, Genève: WHO.
- WHO (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Genève: WHO (WHO/ CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13).
- WHO (2006) *Pesticides and their application for the control of vectors adn pests of public health importance*. 6th Ed. Genève: WHO.
- WHO (2008) WHO position statement on integrated vector management. *Weekly epidemiological record*. 83 (20). p.177–181.
- WHO (2009) *Guidelines for Efficacy Testing of Insecticides for Indoor and Outdoor Ground-Applied Space Spray Applications*. Genève: WHO/HTM/NTD/WHOPES.
- WHO (2011) *Generic risk assessment model for Insecticides used for larviciding*. Genève: WHO.

- WHO (2012) *Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors*. Genève: WHO.
- WHO (2013a) *Larval Source Management: a supplementary measure for malaria vector control*. Genève: WHO.
- WHO (2013b) *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes*. Genève: WHO.
- Wirth, M. C., Walton, W. E. e Federici, B. A. (2010) Evolution of resistance to the *Bacillus sphaericus* Bin toxin is phenotypically masked by combination with the mosquitocidal proteins of *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis*. *Environmental Microbiology*. 12 (5). p.1154–1160.
- Woodbridge, A. F. e Edward, D. W. (2002) Mosquitoes (Culicidae). In Mullen, G. R. and Durden, L. A. (Eds.) *Medical and Veterinary Entomology*. London: Academic Press.

**Anexos**

## Anexos

### Anexo I

As tabelas apresentadas correspondem aos resultados de mortalidade obtidos em cada ensaio, por concentração. Estão indicados o número de larvas e pupas após 24 horas, a percentagem de mortalidade excluindo as pupas do número total de imaturos, e a média de mortalidade e desvio padrão por concentração.

#### Ensaio I

Controlo	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	19	0	6	0	0,00	0,00
II	25	19	0	6	0		

25%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	19	3	3	13,64	6,82	9,64
II	25	22	0	3	0,00		

50%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	16	4	5	20,00	12,50	10,61
II	25	19	1	5	5,00		

75%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	14	2	9	12,50	8,33	5,90
II	25	23	1	1	4,17		



100%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
0 h	24 h						
I	25	10	4	11	28,60	29,0	0,59
II	25	12	5	8	29,40		

## Ensaio II

Controlo	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
0 h	24 h						
I	15	15	0	0	0,00	0,00	0,00
II	15	15	0	0	0,00		
III	15	15	0	0	0,00		

25%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
0 h	24 h						
I	15	10	5	0	33,3	31,11	16,78
II	15	13	2	0	13,3		
III	15	8	7	0	46,7		

50%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
0 h	24 h						
I	15	3	12	0	80,00	82,22	3,85
II	15	2	13	0	86,70		
III	15	3	12	0	80,00		

75%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	15	0	15	0	100,00	95,56	3,85
II	15	1	14	0	93,30		
III	15	1	14	0	93,30		

100%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	15	0	15	0	100,00	100,00	0,00
II	15	0	15	0	100,00		
III	15	0	15	0	100,00		

### Ensaio III

Controlo	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	15	15	0	0	0,00	0,00	0,00
II	15	15	0	0	0,00		

10%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	15	5	8	2	61,50	57,44	5,80
II	15	7	8	0	53,30		

20%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	15	1	14	0	93,30	90,00	4,71
II	15	2	13	0	86,67		

30%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	15	0	14	1	100,00	100,00	0,00
II	15	0	15	0	100,00		

35%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	15	0	15	0	100,00	100,00	0,00
II	15	0	15	0	100,00		

40%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	15	0	15	0	100,00	100,00	0,00
II	15	0	15	0	100,00		

50%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	15	0	15	0	100,00	100,00	0,00
II	15	0	15	0	100,00		

65%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	15	0	15	0	100,00	100,00	0,00
II	15	0	15	0	100,00		

100%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	15	0	15	0	100,00	100,00	0,00
II	15	0	15	0	100,00		

#### Ensaio IV- *Culex theileri*

Controlo H <sub>2</sub> O	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	24	1	0	4,00	6,67	4,62
II	25	22	3	0	12,00		
III	25	24	1	0	4,00		

Controlo meio	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	25	0	0	0,00	1,33	2,31
II	25	24	1	0	4,00		
III	25	25	0	0	0,00		

10%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	24	0	1	0,00	0,00	0,00
II	25	25	0	0	0,00		
III	25	25	0	0	0,00		

12,5%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	22	3	0	12,00	4,00	6,93
II	25	25	0	0	0,00		
III	25	25	0	0	0,00		

15%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	17	8	0	32,00	18,67	12,22
II	25	23	2	0	8,00		
III	25	21	4	0	16,00		

20%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	21	4	0	16,00	9,33	8,33
II	25	22	3	0	12,00		
III	25	25	0	0	0,00		

**Ensaio IV- *Anopheles atroparvus***

Controlo H <sub>2</sub> O	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	25	0	0	0,00	0,00	0,00
II	25	25	0	0	0,00		
III	25	25	0	0	0,00		

Controlo meio	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	25	0	0	0,00	0,00	0,00
II	25	25	0	0	0,00		
III	25	25	0	0	0,00		

2%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	24	0	1	0,00	0,00	0,00
II	25	25	0	0	0,00		
III	25	25	0	0	0,00		

4%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	21	4	0	16,00	5,33	9,24
II	25	25	0	0	0,00		
III	25	25	0	0	0,00		

5%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	22	2	1	8,33	10,78	12,19
II	25	25	0	0	0,00		
III	25	19	6	0	24,00		

7%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	23	2	0	8,00	21,33	30,29
II	25	25	0	0	0,00		
III	25	11	14	0	56,00		

### Ensaio V- *Culex theileri*

Controlo H <sub>2</sub> O	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	25	0	0	0,00	0,00	0,00
II	25	25	0	0	0,00		
III	25	25	0	0	0,00		

Controlo meio	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	25	0	0	0,00	1,30	2,30
II	25	24	1	0	4,00		
III	25	25	0	0	0,00		

25%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	14	11	0	44,00	68,00	20,80
II	25	5	20	0	80,00		
III	25	5	20	0	80,00		

50%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	1	24	0	96,00	96,00	4,00
II	25	2	23	0	92,00		
III	25	0	25	0	100,0		

75%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	0	25	0	100,00	100,00	0,00
II	25	0	25	0	100,00		
III	25	0	25	0	100,00		

100%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	0	25	0	100,00	100,00	0,00
II	25	0	25	0	100,00		
III	25	0	25	0	100,00		



**Ensaio V- *Anopheles atroparvus***

Controlo H <sub>2</sub> O	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	25	0	0	0,00	0,00	0,00
II	25	25	0	0	0,00		
III	25	25	0	0	0,00		

Controlo meio	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	25	0	0	0,00	0,00	0,00
II	25	25	0	0	0,00		
III	25	25	0	0	0,00		

25%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	0	25	0	100,00	100,00	0,00
II	25	0	25	0	100,00		
III	25	0	25	0	100,00		

50%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	0	25	0	100,00	100,00	0,00
II	25	0	25	0	100,00		
III	25	0	25	0	100,00		

75%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	0	25	0	100,00	100,00	0,00
II	25	0	25	0	100,00		
III	25	0	25	0	100,00		

100%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	0	25	0	100,00	100,00	0,00
II	25	0	25	0	100,00		
III	25	0	25	0	100,00		

### Ensaio VI- *Culex theileri*

Controlo H <sub>2</sub> O	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	25	0	0	0,00	1,33	2,31
II	25	24	1	0	4,00		
III	25	25	0	0	0,00		

Controlo meio	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	25	0	0	0,00	4,12	4,01
II	25	23	2	0	8,00		
III	25	22	1	2	4,35		

5%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	23	2	0	8,00	4,00	4,00
II	25	21	0	4	0,00		
III	25	24	1	0	4,00		

10%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	18	3	4	14,29	11,89	3,14
II	25	22	2	1	8,33		
III	25	20	3	2	13,04		

25%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	8	17	0	68,00	70,32	15,61
II	25	3	20	2	87,00		
III	25	1	14	0	56,0		

50%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	3	22	0	88,00	90,67	4,62
II	25	1	24	0	96,00		
III	25	3	22	0	88,00		

**Ensaio VI- *Anopheles atroparvus***

Controlo H <sub>2</sub> O	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	19	0	6	0,00	0,00	0,00
II	25	23	0	2	0,00		
III	25	25	0	0	0,00		

Controlo meio	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	19	0	6	0,00	0,00	0,00
II	25	19	0	5	0,00		
III	25	14	0	11	0,00		

5%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	16	8	1	33,30	39,42	11,72
II	25	6	9	8	53,00		
III	25	17	8	0	32,00		

10%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	4	21	0	84,00	93,22	8,27
II	25	0	24	1	100,00		
III	25	1	22	2	95,65		

15%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	1	24	0	96,00	98,67	2,31
II	25	0	25	0	100,00		
III	25	0	25	0	100,00		

20%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	0	25	0	100,00	100,00	0,00
II	25	0	25	0	100,00		
III	25	0	24	1	100,00		

### Fração I

Controlo meio	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	15	15	0	0	0,00	0,00	0,00
II	15	15	0	0	0,00		
III	15	15	0	0	0,00		

100%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	15	4	11	0	73,33	64,44	10,18
II	15	5	10	0	66,67		
III	15	7	8	0	53,33		

## Fração II

Controlo H <sub>2</sub> O desclorada	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
0 h	24 h						
I	24	14	0	10	0,00	1,19	2,38
II	25	19	0	6	0,00		
III	25	20	1	4	4,76		
IV	25	20	0	5	0,00		

Controlo H <sub>2</sub> O desmineralizada	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
0 h	24 h						
I	26	18	1	7	5,26	1,32	2,63
II	25	17	0	8	0,00		
III	26	17	0	9	0,00		
IV	25	18	0	7	0,00		

30%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
0 h	24 h						
I	25	17	5	3	22,73	17,42	5,11
II	26	19	5	2	20,83		
III	24	19	3	2	13,64		
IV	27	21	3	3	12,50		

60%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
0 h	24 h						
I	25	15	7	3	31,82	38,78	9,56
II	26	15	8	1	32,00		
III	24	11	12	1	52,17		
IV	25	14	9	2	39,13		

100%	Larvas vivas		Larvas mortas (24 h)	Pupas (24 h)	Mortalidade (sem pupas) (%)	Média de Mortalidade (%)	Desvio Padrão
	0 h	24 h					
I	25	3	22	0	88,00	74,29	11,80
II	27	9	18	0	66,67		
III	25	9	15	1	62,50		
IV	26	5	20	1	80,00		